

09/762277

JC03 Rec'd PCT/PTO 06 FEB 2001

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re application of :
Takaki WARITANI et al. : Attn: BOX PCT
Serial No. NEW : Docket No. 2000_1588A
Filed February 6, 2001 :

MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST CANINE TRYPSIN
[Corresponding to PCT/JP99/04299
Filed August 9, 1999]

SUBMISSION OF DEPOSIT RECEIPTS

Assistant Commissioner for Patents
Washington, DC 20231

Sir:

There are submitted herewith copies of the receipts of the deposits of the three microorganisms referred to in the specification.

The deposits have been made under the International Budapest Treaty as accession number(s) FERM BP-6795, FERM BP-6796 and FERM BP-6808.

Respectfully submitted,

Takaki WARITANI et al.

By Warren M. Cheek, Jr.
Warren M. Cheek, Jr.
Registration No. 33,367
Attorney for Applicants

WMC/dlk
Washington, D.C.
Telephone (202) 721-8200
Facsimile (202) 721-8250
February 6, 2001

ATTACHMENT F

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(English Translation)

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF
THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT ISSUED PURSUANT TO RULE 7.1

by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page.

(Name and Address of Depositor)

Fuji Yakuhin Kogyo Kabushiki Kaisha
Representative (President): TAKEDA Yuichiro
530, Chokeiji, Takaoka-shi, Toyama 933-8511 JAPAN

I . IDENTIFICATION REFERENCE TO MICROORGANISM

(Identification reference given by the DEPOSITOR)
Hybridoma 008-207(Accession number
given by the NIBH)
FERM BP- 6795

II . SCIENTIFIC DESCRIPTION AND TAXONOMIC DESIGNATION

Deposit identified in the above item I was accompanied by:

☒ a scientific description
☒ a proposed taxonomic designation

III . RECEIPT AND ACCESSION

Deposit identified in the above item I was received on March 9, 1999
(original deposit date) by this International Depositary Authority as
(have) been accepted.

IV . RECEIPT OF TRANSFER REQUEST

Deposit identified in the above item I was received on March 9, 1999
(original deposit date) by this International Depositary Authority.
This International Depositary Authority also received a request for
transferring the original deposit to one under Budapest Treaty
on July 26, 1999 .

(Transferred from FERM P- 17290 deposited on March 9, 1999)

V . INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

National Institute of Bioscience and Human-Technology
Agency of Industrial Science and Technology

(Signature of person having the power to represent the NIBH)

Dr. Shinichi OHASHI, Director-General (Seal)Address: 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi Ibaraki-ken
305-8566, JAPAN

Date: July 26, 1999

THIS PAGE BLANK (USPTO)

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY identified at the bottom of this page.

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約

下記国際寄託当局によって規則 7. 1 に従い
発行される。

原寄託についての受託証

氏名 (名称)

富士薬品工業株式会社

代表取締役社長 竹田 雄一郎

寄託者

あて名 〒

富山県高岡市長慶寺 5 3 0 番地

殿

1. 微生物の表示

(寄託者が付した識別のための表示)

ハイブリドーマ 008-207

(受託番号)

FERM BP- 6795

2. 科学的性質及び分類学上の位置

1 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

- 科学的性質
- 分類学上の位置

3. 受領及び受託

本国際寄託当局は、平成 11 年 3 月 9 日 (原寄託日) に受領した 1 欄の微生物を受託する。

4. 移管請求の受領

本国際寄託当局は、平成 11 年 3 月 9 日 (原寄託日) に 1 欄の微生物を受領した。
そして、平成 11 年 7 月 26 日 に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。
(平成 11 年 3 月 9 日に寄託された微工研菌寄第 P- 17290 号より移管)

5. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

名称: National Institute of Bioscience and Human-Technology
Agency of Industrial Science and Technology

所長 大箸 信

Dr. Shinobu Ohsaki Director-General

あて名: 日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号 (郵便番号 305-8566)

1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken
305-8566, JAPAN

平成 11 年 (1999) 7 月 26 日

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(English Translation)

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF
THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT ISSUED PURSUANT TO RULE 7.1

by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page.

(Name and Address of Depositor)

Fuji Yakuhin Kogyo Kabushiki Kaisha
Representative (President): TAKEDA Yuichiro
530, Chokeiji, Takaoka-shi, Toyama 933-8511 JAPAN

I . IDENTIFICATION REFERENCE TO MICROORGANISM

(Identification reference given by the DEPOSITOR)
Hybridoma 009-303

(Accession number
given by the NIBH)
FERM BP- 6796

II . SCIENTIFIC DESCRIPTION AND TAXONOMIC DESIGNATION

Deposit identified in the above item I was accompanied by:

 X a scientific description
 X a proposed taxonomic designation

III . RECEIPT AND ACCESSION

Deposit identified in the above item I was received on March 9, 1999
(original deposit date) by this International Depositary Authority as
(have) been accepted.

IV . RECEIPT OF TRANSFER REQUEST

Deposit identified in the above item I was received on March 9, 1999
(original deposit date) by this International Depositary Authority.
This International Depositary Authority also received a request for
transferring the original deposit to one under Budapest Treaty
on July 26, 1999 .
(Transferred from FERM P- 17291 deposited on March 9, 1999)

V . INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

National Institute of Bioscience and Human-Technology
Agency of Industrial Science and Technology

(Signature of person having the power to represent the NIBH)

Dr. Shinichi OHASHI, Director-General (Seal)

Address: 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi Ibaraki-ken
305-8566, JAPAN

Date: July 26, 1999

THIS PAGE BLANK (USPTO)

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY identified at the bottom of this page.

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約

下記国際寄託当局によって規則 7. 1 に従い
発行される。

原寄託についての受託証

氏名 (名称)

富士薬品工業株式会社

代表取締役社長 竹田 雄一郎

殿

寄託者

あて名 〒

富山県高岡市長慶寺 5 3 0 番地

1. 微生物の表示

(寄託者が付した識別のための表示)

ハイブリドーマ 009-303

(受託番号)

FERM BP- 6796

2. 科学的性質及び分類学上の位置

1 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

- 科学的性質
- 分類学上の位置

3. 受領及び受託

本国際寄託当局は、平成 11 年 3 月 9 日 (原寄託日) に受領した 1 欄の微生物を受託する。

4. 移管請求の受領

本国際寄託当局は、平成 11 年 3 月 9 日 (原寄託日) に 1 欄の微生物を受領した。
そして、平成 11 年 7 月 26 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。
(平成 11 年 3 月 9 日に寄託された微工研菌寄第 P- 17291 号より移管)

5. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

名称: National Institute of Bioscience and Human-Technology
Agency for Industrial Science and Technology

所長 大箸 信一

Dr. Shinichi Oshikiri Director-General

あて名: 日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号 (郵便番号 305-8566)

1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken
305-8566, JAPAN

平成 11 年 (1999) 7 月 26 日

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(English Translation)

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF
THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT ISSUED PURSUANT TO RULE 7.1

by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page.

(Name and Address of Depositor)

Fuji Yakuhin Kogyo Kabushiki Kaisha
Representative (President): TAKEDA Yuichiro
530, Chokeiji, Takaoka-shi, Toyama 933-8511 JAPAN

I . IDENTIFICATION REFERENCE TO MICROORGANISM

(Identification reference given by the DEPOSITOR)
Hybridoma 004-203

(Accession number
given by the NIBH)
FERM BP- 6808

II . SCIENTIFIC DESCRIPTION AND TAXONOMIC DESIGNATION

Deposit identified in the above item I was accompanied by:

 X a scientific description
 X a proposed taxonomic designation

III . RECEIPT AND ACCESSION

Deposit identified in the above item I was received on July 28, 1998
(original deposit date) by this International Depositary Authority as
(have) been accepted.

IV . RECEIPT OF TRANSFER REQUEST

Deposit identified in the above item I was received on July 28, 1998
(original deposit date) by this International Depositary Authority.
This International Depositary Authority also received a request for
transferring the original deposit to one under Budapest Treaty
on July 30, 1999 .

(Transferred from FERM P- 16914 deposited on July 28, 1998)

V . INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

National Institute of Bioscience and Human-Technology
Agency of Industrial Science and Technology

(Signature of person having the power to represent the NIBH)

Dr. Shinichi OHASHI, Director-General (Seal)

Address: 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi Ibaraki-ken
305-8566, JAPAN

Date: July 30, 1999

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURERECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this
page.

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブタベスト条約

下記国際寄託当局によって規則 7. 1 に従い
発行される。

原寄託についての受託証

氏名 (名称)

富士薬品工業株式会社

代表取締役社長 竹田 雄一郎

寄託者

あて名 〒

富山県高岡市長慶寺 5 3 0 番地

殿

1. 微生物の表示

(寄託者が付した識別のための表示)

ハイブリドーマ 004-203

(受託番号)

FERM BP- 6808

2. 科学的性質及び分類学上の位置

1 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

- 科学的性質
- 分類学上の位置

3. 受領及び受託

本国際寄託当局は、平成 10 年 7 月 28 日 (原寄託日) に受領した 1 欄の微生物を受託する。

4. 移管請求の受領

本国際寄託当局は、平成 10 年 7 月 28 日 (原寄託日) に 1 欄の微生物を受領した。
そして、平成 11 年 7 月 30 日 に原寄託よりブタベスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。
(平成 10 年 7 月 28 日 に寄託された微工研菌寄第 P-16914 号より移管)

5. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

名称: National Institute of Advanced Industrial Science and Technology
Agency of Industrial Science and Technology

所長 大箸 信

Dr. Shinobu Oshiki Director-General

あて名: 日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号 (郵便番号 305-8566)

1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken
305-8566, JAPAN

平成 11 年 (1999) 7 月 30 日





PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

| | | |
|---|-----------|--|
| (51) 国際特許分類7 C12P 21/08, C07K 16/40, 16/18, C12Q 1/34, G01N 33/573, 33/577, C12N 15/06 | A1 | (11) 国際公開番号 WO00/09739 (43) 国際公開日 2000年2月24日 (24.02.00) |
| (21) 国際出願番号 PCT/JP99/04299 (22) 国際出願日 1999年8月9日 (09.08.99) (30) 優先権データ 特願平10/236609 1998年8月10日 (10.08.98) JP 特願平11/63990 1999年3月10日 (10.03.99) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 富士薬品工業株式会社 (FUJI YAKUHIN KOGYO KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒933-8511 富山県高岡市長慶寺530番地 Toyama, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) 割谷孝貴 (WARITANI, Takaki)[JP/JP] 芦田佳典 (ASHIDA, Yoshinori)[JP/JP] 〒933-8511 富山県高岡市長慶寺530番地 富士薬品工業株式会社内 Toyama, (JP) 山田隆紹 (YAMADA, Takatsugu)[JP/JP] 〒192-0364 東京都八王子市南大沢4丁目40番地の3 Tokyo, (JP) | | (74) 代理人 弁理士 水野昭宣 (MIZUNO, Akinobu) 〒150-0044 東京都渋谷区円山町22番12 ライオンズマンション渋谷道玄坂303 Tokyo, (JP) (81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) 添付公開書類 国際調査報告書 |
| (54) Title: MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST CANINE TRYPSIN (54) 発明の名称 イヌトリプシンに対するモノクローナル抗体 (57) Abstract The dynamics <i>in vivo</i> of trypsin, in particular, canine trypsin and/or canine trypsin-like immunoreactants have attracted attention in analyzing the relation thereof with various diseases such as pancreatic diseases. Since trypsin has two subclasses, i.e., the cationic type and the anionic type and, therefore, occurs in various forms, it is also required to assay individual types thereof. To satisfy the above requirement, a method for accurately quantitating trypsin or a method for detecting trypsin is provided. A monoclonal antibody immunologically reacting specifically with trypsin can be obtained by the cell fusion method by using as an immunogen trypsin, in particular, canine trypsin or a region containing its specific amino acid sequence or neighborhood thereof. By using the thus obtained monoclonal antibody as an assay reagent, trypsin and/or trypsin-like immunoreactants occurring in various forms can be quickly and accurately assayed by, in particular, the sandwich assay method, etc. Moreover, the clinical meaning of the ratio of trypsin, etc. in diseases (acute pancreatitis, chronic pancreatitis, pancreatic cancer, renal insufficiency, extrapancreatic hyposecretion, etc.) can be clarified thereby. | | |

要約

トリプシン、特にイヌトリプシン及び／又はイヌトリプシン様免疫反応物質の体内動態は、膵臓疾患などの各種疾患との関わりを解析するうえで注目されている。トリプシンはカチオン型及びアニオン型の2つのサブクラスが存在するなど各種の形態で存在するものを分別して測定することも求められており、こうした目的に合致したトリプシンの正確な定量あるいは測定検知法を提供する。トリプシン、特にイヌトリプシン及びその特定のアミノ酸配列又はその近傍を含む領域を免疫原として用いて、細胞融合法でトリプシンと特異的に免疫学的反応するモノクローナル抗体が得られる。得られたモノクローナル抗体を測定試薬として用い、特にサンドイッチアッセイなどにより迅速、正確に、そして各種の形態で存在するトリプシン及び／又はトリプシン様免疫反応物質の各割合を測定できる途が開かれる。さらに急性膵炎、慢性膵炎、膵癌、腎不全、膵外分泌不全などの疾患における各トリプシン等のそれぞれの比率の臨床的な意義を解明できる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

| | | | |
|-----------------|------------|-------------------|---------------|
| AE アラブ首長国連邦 | DM ドミニカ | KZ カザフスタン | RU ロシア |
| AL アルバニア | EE エストニア | LC セントルシア | SD スーダン |
| AM アルメニア | ES スペイン | LI リヒテンシュタイン | SE スウェーデン |
| AT オーストリア | FI フィンランド | LK スリ・ランカ | SG シンガポール |
| AU オーストラリア | FR フランス | LR リベリア | SI スロヴェニア |
| AZ アゼルバイジャン | GA ガボン | LS レント | SK スロヴァキア |
| BA ボスニア・ヘルツェゴビナ | GB 英国 | LT リトアニア | SL シエラ・レオネ |
| BB バルバドス | GD グレナダ | LU ルクセンブルグ | SN セネガル |
| BE ベルギー | GE ジョージア | LV ラトヴィア | SZ スワジランド |
| BF ブルキナ・ファソ | GH ガーナ | MA モロッコ | TD チャード |
| BG ブルガリア | GM ガンビア | MC モナコ | TG トーゴ |
| BJ ベナン | GN ギニア | MD モルドヴァ | TJ タジキスタン |
| BR ブラジル | GW ギニア・ビサウ | MG マダガスカル | TZ タンザニア |
| BY ベラルーシ | GR ギリシャ | MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア | TM トルクメニスタン |
| CA カナダ | HR クロアチア | 共和国 | TR トルコ |
| CF 中央アフリカ | HU ハンガリー | ML マリ | TT トリニダード・トバゴ |
| CG コンゴ | ID インドネシア | MN モンゴル | UA ウクライナ |
| CH スイス | IE アイルランド | MR モーリタニア | UG ウガンダ |
| CI コートジボアール | IL イスラエル | MW マラウイ | US 米国 |
| CM カメルーン | IN インド | MX メキシコ | UZ ウズベキスタン |
| CN 中国 | IS アイスランド | NE ニジェール | VN ヴェトナム |
| CR コスタ・リカ | IT イタリア | NL オランダ | YC ユーゴスラビア |
| CU キューバ | JP 日本 | NO ノルウェー | ZA 南アフリカ共和国 |
| CY キプロス | KE ケニア | NZ ニュー・ジーランド | ZW ジンバブエ |
| CZ チェコ | KG キルギスタン | PL ポーランド | |
| DE ドイツ | KP 北朝鮮 | PT ポルトガル | |
| DK デンマーク | KR 韓国 | RO ルーマニア | |

明 細 書

イヌトリプシンに対するモノクローナル抗体

技術分野

本発明は、イヌトリプシンあるいはそれに関連した物質に対するモノクローナル抗体、該抗体を使用するトリプシン及び／又はトリプシン様免疫反応物質の免疫学的測定方法並びに該抗体を含有するトリプシン及び／又はトリプシン様免疫反応物質の免疫学的測定試薬に関する。別の観点からは、本発明は上記免疫学的測定試薬及び／又は上記免疫学的測定方法を使用しての、急性膵炎、慢性膵炎、膵癌、膵外分泌不全などの膵臓疾患、腎不全などの内臓疾患などの病気あるいは疾患の診断方法、更にはそのための診断薬にも関する。

背景技術

トリプシンは、ヒト、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギなどの種々の動物に存在するプロテアーゼ（蛋白分解酵素）の一種で膵臓の膵腺房細胞で酵素前駆体であるトリプシノーゲンとして生合成され、十二指腸に分泌され、エンテロキナーゼ又はトリプシンによって加水分解を受けて活性型であるトリプシンとなり、腸内で主として食物タンパク質類の消化に働く。また、キモトリプシノーゲン、プロカルボキシペプチダーゼ、プロホスホリパーゼなど他の酵素前駆体を限定分解し、それを活性化する。また、ヒトトリプシノーゲンは、カチオン型（Cationic Trypsinogen）とアニオン型（Anionic Trypsinogen）の二つのサブタイプがあることが知られている。

トリプシンは膵臓のみで産生される臓器特異性の高い酵素であり、また膵酵素の中でも極めて特異性の高い酵素であり、その変動は膵臓の状態、例えば、膵疾患を示唆するなど注目されてきている。血中においてトリプシンは、正常では不活性型のトリプシノーゲンとして存在しているが、膵炎などの疾患が存在すると

傷害を受けた膵臓細胞から逸脱した活性型のトリプシンは、血中で $\alpha 1$ -アンチトリプシン、 $\alpha 2$ -マクログロブリン等のインヒビターと結合した複合体として存在することから、通常血中トリプシンはそれら全てを網羅したかたちで TLI (Trypsin like immunoreactivity: トリプシン様免疫反応物質) と言われている。

こうした血中TLI に関連しては、ヒトでは急性膵炎、膵癌、腎不全ではその血中TLI が上昇していること、一方膵外分泌不全、慢性膵炎ではその血中TLI は低い値を示していることが知られている（血中酵素の免疫学的測定と臨床応用, pp. 223-231, 1984, へるす出版）。さらにヒトでは、尿中トリプシン量を測定することにより、膵炎を診断することが行われている (N. Engl. J. Med., 336, p. 1788-1793, 1997)。

トリプシンの測定法としては、ベンゾイル-L-アルギニンアミドなどの基質を用いてトリプシンの酵素活性を測定することによる方法が報告されているが、これらの方法では血中トリプシンを測定しようとする場合、上記したようにトリプシンは血中では $\alpha 1$ -アンチトリプシン、 $\alpha 2$ -マクログロブリン等のインヒビターと結合しているものも存在しているため正確な測定ができないという問題がある。

こうした欠点を解決するために、トリプシンを免疫学的に測定しようとする方法（イムノアッセイ）が開発されてきた。従来、このイムノアッセイに使用する抗体としては、ウサギ等の動物を抗原で免疫して得られた血清より分離して作製されていた（こうして作製された抗体はポリクローナル抗体である）。このような方法では、抗体を作製する毎に大量の精製された抗原が必要であるとか、得られる抗体の量が少ないとか、得られた抗体自体均質なものではない（例えば、力価が必ずしも一定しないとか、様々な抗原に対する抗体が混在する）等の問題があり、より精密で正確な測定や再現性の高い測定を行うことは困難であり、さらには血中などの生体内でカチオニック型やアニオニック型といった二つのサブタイプを含めて様々な形態で存在するトリプシンを区別して測定することは不可能であった。

ヒトにおいては、安価に且つトリプシンに対するより均一な抗体を得る目的で

、細胞融合技術を利用して得られたハイブリドーマの産生するモノクローナル抗体の開発が進められ、ヒト アニオニック トリプシンを認識するモノクローナル抗体の報告がなされている (N. Engl. J. Med., 336, pp. 1788-1793, 1997)。

一方、獣医学領域でも、特にイヌにおいて血中TLI をポリクローナル抗体を用いて測定することが行われ、急性膵炎ではその量が初期に増加し (Am. J. Vet. Res., Vol. 50, No. 5, pp. 629-632, 1989)、膵外分泌不全では著減することが知られている (J. Am. Vet. Med. Assoc., 192, pp. 195-201, 1988; J. Small Anim. Pract., 24, pp. 583-588, 1983)。

ところで、イヌトリプシノーゲンは、カチオニック型とアニオニック型の二つのサブタイプがあり、その遺伝子は既にクローニングされており、それぞれカチオニック型が配列表の配列番号：2で示されるようなアミノ酸配列であるもの、そしてアニオニック型が配列表の配列番号：1で示されるようなものであり、配列表に示されたアミノ酸配列のうち Met¹ ~Ala¹⁵ はトランスポート シグナル配列と考えられ、実際のイヌ カチオニック トリプシノーゲンは配列表の配列番号：2で示されるアミノ酸配列の第16番目のPhe から第246番目のAsn までの231個のアミノ酸残基からなり、同様にイヌ アニオニック トリプシノーゲンは配列表の配列番号：1で示されるアミノ酸配列の第16番目のThr から第247番目のSer までの232個のアミノ酸残基からなるとされている。そして、N 末側の8残基が切断されて、イヌ カチオニック トリプシンでは 223個のアミノ酸残基を有し、そしてイヌ アニオニック トリプシンでは 224個のアミノ酸残基を有する活性型のトリプシンとなる (Mol. Cell. Biol., 5, 2669-2676, 1985)。

ヒトにおいては、現在のところポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体を組み合わせたRIA 法 (Radioimmunoassay)、EIA法 (Enzymeimmunoassay)等のキットが各種販売されていたり、尿中TLI 測定を目指したラテラルフロー法を用いたヒト アニオニック トリプシンを認識するモノクローナル抗体を含むキットも存在しているが、これらキットではイヌのTLI の測定はできなかった。

イヌトリプシンを測定するためのキットとしては、イヌ膵臓より精製したカチオニック トリプシンをウサギに免疫し、得られたポリクローナル抗体を使用したRIA キットがある (J. Am. Vet. Med. Assoc., 192, pp.195-201, 1988; J. Small Anim. Pract., 24, pp.583-588, 1983 など) が、生体内でカチオニック型やアニオニック型といった二つのサブタイプを含めて、不活性型のトリプシノーゲン、遊離の活性型トリプシン、さらには $\alpha 1$ -アンチトリプシン、 $\alpha 2$ -マクログロブリン等のインヒビターと結合しているものなど様々な形態で存在しているものを、各存在形態毎の割合を含めて測定することはできない。

上記したように生体内で様々な形態で存在しているトリプシンは、疾患に応じてその各種の形態で存在するトリプシンの割合などにも変化が起こっていると考えられているが、そうした割合などの変化を正確に把握することができれば、各種疾患の診断に利用できる。しかしながら、ヒトにおいて開発されているモノクローナル抗体を使用した測定系では、イヌトリプシンの測定は全く不可能であり、またポリクローナル抗体を使用したイヌトリプシン測定系では、上記各種の形態で存在するトリプシンの割合などを測定することは不可能であり、疾患に応じて変化するTLI の存在比率などを詳細に検討することはできない。

さらに、安全性とか、取扱に特別な注意を要し、その測定後の廃棄の点でも問題のある放射性ラベルを使用しなくとも、より感度の高い測定系を構築することも求められている。したがって、その各存在形態相互の割合を含めて、迅速且つ正確に、そして簡便で且つ安全な手法で選択的に測定することは、病気あるいは疾患の診断の上からも有益である。

かくして、より選択性の高いイヌトリプシンを測定するため測定系の開発が求められている。

発明の開示

上記したような課題を解決するため、鋭意研究を行った結果、イヌトリプシンに対して免疫反応するモノクローナル抗体の作製に成功し、さらにはこのようにして作製された抗イヌトリプシンモノクローナル抗体を使用することにより、選択性の高いイヌトリプシン測定系の開発に至った。

すなわち、本発明は、

〔1〕 イヌトリプシンあるいはイヌトリプシン関連物質に対するモノクローナル抗体；

〔2〕 カチオニック イヌトリプシノーゲン、アニオニック イヌトリプシノーゲン、カチオニック イヌトリプシン、アニオニック イヌトリプシン及びそれから誘導されるイヌトリプシン関連物質からなる群から選ばれたものに対する抗体であることを特徴とする上記〔1〕記載のモノクローナル抗体；

〔3〕 (a) 配列表の配列番号1又は配列番号2のタンパク質またはその塩及び(b) その部分ペプチドまたはその塩からなる群から選ばれたものに対する抗体であることを特徴とする上記〔1〕記載のモノクローナル抗体；

〔4〕 カチオニック イヌトリプシノーゲン、カチオニック イヌトリプシン、及びそれから誘導されるカチオニック イヌトリプシン関連物質からなる群から選ばれたものに対する抗体であることを特徴とする上記〔1〕～〔3〕のいずれか一記載のモノクローナル抗体；

〔5〕 該抗体が、

- (1) 配列表の配列番号1のThr¹⁶～Ser²⁴⁷で表されるアミノ酸配列、
 - (2) 配列表の配列番号1のIle²⁴～Ser²⁴⁷で表されるアミノ酸配列、
 - (3) 配列表の配列番号2のPhe¹⁶～Asn²⁴⁶で表されるアミノ酸配列、及び
 - (4) 配列表の配列番号2のIle²⁴～Asn²⁴⁶で表されるアミノ酸配列
- からなる群から選ばれたいずれかの配列に対するものであることを特徴とする上記〔1〕～〔3〕のいずれか一記載のモノクローナル抗体；

〔6〕 上記〔1〕～〔5〕のいずれか一記載のモノクローナル抗体を測定試薬として用いることを特徴とするトリプシン及び／又はトリプシン様免疫反応物質の免疫学的測定方法；

〔7〕 トリプシン様免疫反応物質が、トリプシノーゲン、トリプシン、及びインヒビターとの複合体からなる群から選ばれたいずれかであることを特徴とする上記〔6〕記載の方法；

〔8〕 上記〔1〕～〔5〕のいずれか一記載のモノクローナル抗体を含むことを特徴とするトリプシン及び／又はトリプシン様免疫反応物質の免疫学的測

定試薬；及び

〔9〕 トリプシン様免疫反応物質が、トリプシノーゲン、トリプシン、及びインヒビターとの複合体からなる群から選ばれたいずれかであることを特徴とする上記〔8〕記載の試薬を提供する。

別の態様では、本発明は、

〔10〕 固相化されたモノクローナル抗体であることを特徴とする上記〔1〕～〔5〕のいずれか一記載の抗体；

〔11〕 標識化されたモノクローナル抗体であることを特徴とする上記〔1〕～〔5〕のいずれか一記載の抗体；

〔12〕 酵素又は金属粒子で標識化されたものであることを特徴とする上記〔1〕～〔5〕のいずれか一記載の抗体；及び

〔13〕 モノクローナル抗体のFab'を標識化したものであることを特徴とする上記〔1〕～〔5〕のいずれか一記載の抗体を提供する。

また、別の態様に従えば、本発明は、

〔14〕 上記〔1〕～〔5〕のいずれか一記載の抗体であって、(i) 固相化されたものと(ii) 標識化されたものとの少なくとも二種を用いることを特徴とする上記〔6〕記載の方法；

〔15〕 イヌトリプシンあるいはイヌトリプシン関連物質を定量的に測定することを特徴とする上記〔6〕記載の方法；

〔16〕 測定検体が、血液、血清、血漿、関節液、尿、唾液、糞、組織抽出液、培養細胞抽出液及び細胞培養上清からなる群から選ばれたものであることを特徴とする上記〔6〕又は〔15〕記載の方法；

〔17〕 上記〔6〕、〔7〕、〔14〕～〔16〕のいずれか一記載の方法に用いられるものであって、(i) 上記〔1〕～〔5〕のいずれか一記載の抗体であり且つ固相化されたものを含有する試薬と(ii) 上記〔1〕～〔5〕のいずれか一記載の抗体であり且つ標識化されたものを含有する試薬との少なくとも二種の試薬を有するトリプシン測定用試薬セット；

〔18〕 (a) 配列表の配列番号 1 又は配列番号 2 のタンパク質またはその塩及び(b) その部分ペプチドまたはその塩からなる群から選ばれたものに対するモノクローナル抗体を産生し、且つ(a) 配列表の配列番号 1 又は配列番号 2 のタンパク質またはその塩及び(b) その部分ペプチドまたはその塩から選ばれたもので免疫したマウスなどの動物の脾臓細胞とマウスなどの動物のミエロマ細胞などの永代培養可能な細胞との細胞融合によって得られることを特徴とするハイブリドーマ；及び

〔19〕 (a) 配列表の配列番号 1 又は配列番号 2 のタンパク質またはその塩及び(b) その部分ペプチドまたはその塩からなる群から選ばれたもので免疫したマウスなどの動物の脾臓細胞とマウスなどの動物のミエロマ細胞などの永代培養可能な細胞とを細胞融合せしめ、(a) 配列表の配列番号 1 又は配列番号 2 のタンパク質またはその塩及び(b) その部分ペプチドまたはその塩から選ばれたものに対するモノクローナル抗体を産生する永代培養可能な細胞を選択することを特徴とする上記〔18〕記載のハイブリドーマの作製法を提供する。

さらに、別の態様に従えば、本発明は、

〔20〕 上記〔1〕～〔5〕のいずれか一記載の抗体と、被検試料及び標識化されたイヌトリプシンあるいはイヌトリプシン関連物質とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化されたイヌトリプシンあるいはイヌトリプシン関連物質の割合を測定することを特徴とする被検試料中のトリプシン及び／又はトリプシン様免疫反応物質の定量方法；

〔21〕 被検試料と担体上に不溶化した上記〔1〕～〔5〕のいずれか一記載の抗体及び標識化された上記〔1〕～〔5〕のいずれか一記載の抗体とを反応せしめ、不溶化担体上の標識あるいは不溶化担体と結合しない標識を測定することを特徴とする被検試料中のトリプシン及び／又はトリプシン様免疫反応物質の定量方法；及び

〔22〕 (a) 乾燥キャリアに液体試料（あるいは湿潤試料）が適用され得るように配置され、(b)(i)湿潤状態において該キャリア内部を自由に移動し得る、検体に対して特異結合性の標識された試薬と、(ii)キャリア材料上の検出区域に

永久的に固定化されており、従って湿潤状態でも移動しない、同検体に対して特異結合性の無標識試薬とを含んでおり、(c) 標識された試薬(i) と検出区域とは相互に空間的に分離されており、適用された液体試料（あるいは湿潤試料）が標識された試薬(i) を溶出化して後に検出区域に浸透するように該標識された試薬(i) と検出区域との位置関係が決定されており、さらに該標識された試薬(i) が検出区域において結合された程度などの結果を観察できる手段を含有している試験系（例えば、分析試験装置）であって、該検体はトリプシン及びトリプシン様免疫反応物質からなる群から選ばれたもので、該試薬のうち少なくとも一つが上記〔1〕～〔5〕のいずれか一記載の抗体であることを特徴とする試験系（例えば、分析試験装置）を提供する。

本発明のその他の目的、特徴、優秀性及びその有する観点は、以下の記載より当業者にとっては明白であろう。しかしながら、以下の記載及び具体的な実施例等の記載を含めた本件明細書の記載は本発明の好ましい態様を示すものであり、説明のためにのみ示されているものであることを理解されたい。本明細書に開示した本発明の意図及び範囲内で、種々の変化及び／又は改変（あるいは修飾）をなすことは、以下の記載及び本明細書のその他の部分からの知識により、当業者には容易に明らかであろう。本明細書で引用されている全ての特許文献及び参考文献は、説明の目的で引用されているもので、それらは本明細書の一部としてその内容はここに含めて解釈されるべきものである。

本明細書において、用語「及び／又は」とは、(1)併合的接続関係と(2)選択的接続関係の両方が存在することを意味しており、例えば「トリプシン及び／又はトリプシン様免疫反応物質」の場合では(1)トリプシン及びトリプシン様免疫反応物質並びに(2)トリプシン又はトリプシン様免疫反応物質の両方を包含する意味で使用されている。その他においても用語「及び／又は」は同様に(1)併合的接続関係と(2)選択的接続関係の両方を包含する意味で使用されている。

図面の簡単な説明

図1には、抗トリプシンモノクローナル抗体によるウエスタンブロッティングが示してある。精製したトリプシン (2.5 μ g/lane) をSDS-PAGE (還元条件下) で展開し、ニトロセルロース膜に転写、抗トリプシンモノクローナル抗体 005-208で染色した。

図2には、1ステップサンドイッチEIA 法により得られた、試料中のイヌトリプシン濃度と A_{405} との関係が示されている。

図3には、2ステップサンドイッチEIA 法により得られた、試料中のイヌトリプシン濃度と A_{405} との関係が示されている。

発明を実施するための最良の形態

本発明は、イヌトリプシンあるいはイヌトリプシン関連物質に対するモノクローナル抗体、該抗体を含有する試薬、及び該抗体を使用したイヌトリプシン及び／又はイヌトリプシン様免疫反応物質の検知及び／又は測定方法を提供する。具体的には、カチオニック イヌトリプシノーゲン、アニオニック イヌトリプシノーゲン、カチオニック イヌトリプシン、アニオニック イヌトリプシン及びそれから誘導されるイヌトリプシン関連物質からなる群から選ばれたものに対するモノクローナル抗体、該抗体を用いる免疫学的測定法、該抗体を含む免疫学的測定試薬を提供する。

本発明は、カチオニック型イヌトリプシンあるいはカチオニック型イヌトリプシン関連物質に対するモノクローナル抗体、該抗体を含有する試薬、及び該抗体を使用した選択的なカチオニック型イヌトリプシン及び／又はイヌトリプシン様免疫反応物質の検知及び／又は測定方法を提供する。したがって、各種イヌトリプシン及びイヌトリプシン様免疫反応物質のそれぞれを分別して測定することを可能にせしめ、より正確なかつ有意義な測定、診断方法を提供する。

本発明において、「イヌトリプシンあるいはイヌトリプシン関連物質」とは、天然及びリコンビナント イヌトリプシンあるいはイヌトリプシノーゲン、イヌトリプシンやイヌトリプシノーゲンを断片化したもの、クローニングされて配列

決定された cDNA 配列から推定されるアミノ酸配列に基づき特徴的な配列領域を選び、ポリペプチドをデザインして化学合成して得られた合成ポリペプチド断片、さらには、配列表の配列番号 1 若しくは配列番号 2 のタンパク質又はその塩、及びその部分ペプチド又はその塩を含むものである。

イヌトリプシンには、カチオニック型 (Cationic) とアニオニック型 (Anionic) の二つのサブタイプがあり、活性型イヌトリプシンはトリプシノーゲンがプロセッシングを受けて生成され、さらに活性型トリプシンは生体内、例えば、血中で $\alpha 1$ -アンチトリプシン、 $\alpha 2$ -マクログロブリン等のインヒビターと結合した複合体としても存在する。また活性型トリプシンはペプチダーゼで分解などされ、生体内で代謝される。またイヌトリプシン遺伝子からの転写翻訳して得られる産物は、その配列中にトランスポート シグナル配列を含むが、それは分泌の過程で除去される。また、配列表の配列番号：1 及び 2 で示されたアミノ酸配列の内適宜特徴的な配列領域 (部分ペプチド) はトリプシンに関連した物質と認識できる。

生体内、例えば、血中などでトリプシン様の免疫反応を示す物質、例えば、不活性型のトリプシノーゲン、活性トリプシン、血中で $\alpha 1$ -アンチトリプシン、 $\alpha 2$ -マクログロブリン等のインヒビターと結合した複合体などは一般的にトリプシン様免疫反応物質と言われ、その動態は各種の疾患、例えば、急性膵炎、慢性膵炎、膵癌、腎不全、さらには慢性膵炎の末期、膵外分泌不全などを診断したり、その病状の程度を判断する上で注目される。

本発明に係わるモノクローナル抗体は、公知の方法に準じてイヌ膵臓あるいは膵液から精製されたイヌトリプシンあるいはその断片を免疫原として公知の方法で動物を免疫したりし、当該分野で知られたあるいは汎用されている方法、例えばケラー、ミルシュタインらの方法 (Nature, 256: 495-97, 1975) あるいはそれに準じて製造することができる。この方法において、免疫原としては、天然型トリプシン、天然型トリプシノーゲン、リコンビナント トリプシン及び既に報告のあるトリプシンのアミノ酸配列中の適当な領域から選択されたアミノ酸配列を有する合成ペプチドあるいはタンパク質から得られた断片、例えば連続した少な

くとも8個のアミノ酸からなるトリプシンの一部のアミノ酸配列を有する合成ペプチド、例えば14個のアミノ酸残基を有するアミノ酸配列を有する合成ペプチド、好ましくはトリプシンにおいて特徴的な配列部分を有するペプチド等の何れでも使用することができる。こうした合成ペプチドのデザインは、配列表に示された配列番号1及び配列番号2のアミノ酸配列 (Mol. Cell. Biol., 5, pp.2669-2676, 1985)を参照して適宜行うことが可能である。

免疫原は、好ましくは、例えば、David et al.の報告 (Biochem. Soc. Trans., Vol.11, No.4, 603rd MEETING, LIVERPOOL, PP.351, 1983) に準じてイヌ膵臓から単離精製せしめられたトリプシン、すなわち、カチオニック トリプシンあるいはアニオニック トリプシンを用いることができる。特に好ましくは、こうして精製されたカチオニック イヌトリプシンを使用して特異的なモノクローナル抗体が得られる。またトリプシノーゲンやトリプシンのうちの特定の抗原決定部位を認識する抗体を得る目的では、例えば、(i) カチオニック トリプシンとアニオニック トリプシンとの間で異なるアミノ酸配列領域あるいはその相違の顕著な領域を選択して抗原ペプチドをデザインし合成して免疫に使用し、カチオニック トリプシンとアニオニック トリプシンとを選択的に測定することを可能にする抗体を作製したり、(ii)カチオニック トリプシンとアニオニック トリプシンとの間でその相同性のある配列領域あるいは相同性の高い配列領域を選択して抗原ペプチドをデザインし合成して免疫に使用し、カチオニック トリプシンとアニオニック トリプシンとの双方を測定することを可能にする抗体を作製したり、(iii) トリプシノーゲンに存在するが、トリプシンでは活性化のプロセッシングの過程で除去される N末端の残基、例えば、トリプシノーゲンの N末の 7~8 残基からなる配列領域あるいはその一部又は全部を含有する特徴的な配列領域を選択して抗原ペプチドをデザインし合成して免疫に使用し、トリプシノーゲンとトリプシンとを選択的に測定することを可能にする抗体を作製したり、さらには(iv)トリプシンインヒビターの結合する配列領域あるいはその近傍領域を選択して抗原ペプチドをデザインし合成して免疫に使用し、必要に応じて当該トリプシンインヒビターに免疫反応する抗体も作製して使用し、トリプシンとトリプシンインヒビター-コンプレックス (Trypsin-Inhibitor Complex)とを選択

的に測定することを可能にする抗体を作製したりなどできる。

トリプシンとしては、生体内外の産生細胞、例えば、培養細胞、摘出組織、培養組織などから得ることができ、例えば、膵臓の腺房細胞などの細胞、膵組織、膵液などから得ることができる。さらに、トリプシンは、リコンビナントトリプシンとして得ることができ、例えば、膵臓の腺房細胞、膵組織などのトリプシン産生細胞・組織から遺伝子組換えの技術、例えば、Mol. Cell. Biol., 5, pp. 2669-2676, 1985 に記載の方法を利用して得ることができる。本発明で調製したトリプシンあるいはそれから誘導されたものが免疫抗原として好適に使用できる。これらトリプシンは、各種原料、例えば培養細胞、培養組織など、形質転換体細胞などの抗原産生材料から従来公知の方法、例えば硫酸アンモニウム沈殿法などの塩析、セファデックスなどによるゲルろ過法、例えばジエチルアミノエチル基あるいはカルボキシメチル基などを持つ担体などを用いたイオン交換クロマトグラフィー法、例えばブチル基、オクチル基、フェニル基など疎水性基を持つ担体などを用いた疎水性クロマトグラフィー法、色素ゲルクロマトグラフィー法、電気泳動法、透析、限外ろ過法、アフィニティー・クロマトグラフィー法、高速液体クロマトグラフィー法などにより精製して得ることができる。好ましくは、ポリアクリルアミド電気泳動、モノクローナル抗体などの抗原と特異的に反応する抗体などを固定化したアフィニティー・クロマトグラフィーなどで処理し精製分離処理できる。精製されたりコンビナント トリプシンは、モノクローナル抗体作製のための免疫抗原として好適に使用できる。例えば、ゼラチン-アガロース・アフィニティー・クロマトグラフィー、ヘパリン-アガロース・クロマトグラフィーなどにより精製したものなどが挙げられる。また本発明で得られたトリプシン遺伝子の情報を基にペプチドを合成して、その合成ペプチドをモノクローナル抗体作製のための免疫抗原として好適に使用できる。ペプチド若しくはペプチド誘導体は、ペプチド合成の公知の常套手段を用いて製造することができる。該製造方法は、固相法、液相法のいずれによっても良く、例えば、Ed. by E. Gross & J. Meienhofer, "The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology", Vol. 1-5, Academic Press, New York, U.S.A.; Ed. by S. Udenfriend & J. Meienhofer

r, "The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology", Vol. 6-9, Academic Press, New York, U.S.A.; E. Atherton & R. C. Sheppard, "Solid Phase Peptide Synthesis, a Practical Approach", IRL Press, Oxford (1989); 泉屋信夫ら著, "ペプチド合成", 丸善株式会社 (1975); 泉屋信夫ら著, "ペプチド合成の基礎と実験", 丸善株式会社 (1985); 矢島治明監修, 岡田芳男ら編, "続医薬品の開発 14, ペプチド合成", 廣川書店(1991)などに記載の方法が挙げられる。

以下抗体の作製につき詳しく説明する。

本発明のモノクローナル抗体は、ミエローマ細胞を用いての細胞融合技術を利用して得られたモノクローナル抗体であってよいことはいうまでもない。本発明のモノクローナル抗体は、例えば次のような工程で作製できる。

1. 免疫原性抗原の調製
2. 免疫原性抗原による動物の免疫
3. ミエローマ細胞（骨髄腫細胞）の調製
4. 抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合
5. ハイブリドーマ（融合細胞）の選択及びモノクローン化
6. モノクローナル抗体の製造

1. 免疫原性抗原の調製

抗原としては、上記記載の方法に従い調製したリコンビナントイヌトリプシンあるいはトリプシノーゲン、さらにそこで決定されたトリプシンの情報を基に、適当なオリゴペプチドを化学合成しそれを抗原として利用することができるが、好ましくはDavid et al.の報告 (Biochem. Soc. Trans., Vol.11, No.4, 603rd MEETING, LIVERPOOL, PP.351, 1983) に準じてイヌ膵臓から単離精製せしめられたトリプシン、すなわち、カチオニック トリプシンあるいはアニオニック トリプシンを用いることができ、特に好ましくは、こうして精製されたカチオニック イヌトリプシンを用いる。またトリプシンは、前駆体トリプシン（トリプシノーゲン）や活性型トリプシンを用いることができる。

例えば、免疫原として用いる抗原は、トリプシンを断片化したもの、あるいはク

ローニングされて配列決定されたcDNA配列から推定されるアミノ酸配列に基づき特徴的な配列領域を選び、ポリペプチドをデザインして化学合成して得られた合成ポリペプチド断片であってもよい。抗原タンパク質やポリペプチドは、そのまま適当なアジュバントと混合して動物を免疫するのに使用できるが、さらに免疫原性コンジュゲートなどにし、必要に応じて適当なアジュバントと混合して動物を免疫する。また、免疫原性コンジュゲートは、ポリペプチドなどの抗原断片を適当な縮合剤を介して種々の担体タンパク質類と結合させてハプテンタンパク質の如きものとするにより作製でき、これを用いて特定の配列のみと反応できる（あるいは特定の配列のみを認識できる）モノクローナル抗体をデザインするのに用いることもできる。デザインされるポリペプチドには予めシステイン残基などを付加し、免疫原性コンジュゲートの調製を容易にできるようにしておくことができる。担体タンパク質類と結合させるにあたっては、担体タンパク質類はまず活性化されることができ、こうした活性化にあたり活性化結合基を導入することが挙げられる。

活性化結合基としては、(1) 活性化エステルあるいは活性化カルボキシル基、例えばニトロフェニルエステル基、ペンタフルオロフェニルエステル基、1-ベンゾトリアゾールエステル基、N-スクシンイミドエステル基など、(2) 活性化ジチオ基、例えば 2-ピリジルジチオ基などが挙げられる。担体タンパク質類としては、キーホール・リンペット・ヘモシアニン(KLH)、牛血清アルブミン(BSA)、卵白アルブミン、グロブリン、ポリリジンなどのポリペプチド、細菌菌体成分、例えばBCGなどが挙げられる。

2. 免疫原性抗原による動物の免疫

動物を免疫するには、例えば村松繁、他編、実験生物学講座14、免疫生物学、丸善株式会社、昭和60年、日本生化学会編、続生化学実験講座5、免疫生化学研究法、東京化学同人、1986年、日本生化学会編、新生化学実験講座12、分子免疫学III、抗原・抗体・補体、東京化学同人、1992年などに記載の方法に準じて行うことができる。抗原と共に用いられるアジュバントとしては、例えばフロイント完全アジュバント、リビ(Ribi)アジュバント、百日咳ワクチン、BCG、リビ

ッドA、リポソーム、水酸化アルミニウム、シリカなどが挙げられる。免疫は、例えばBALB/cなどのマウスをはじめとする動物を使用して行われる。抗原の投与量は、例えばマウスに対して約1~400 μg /動物で、一般には宿主動物の腹腔内や皮下に注射し、以後1~4週間おきに、好ましくは1~2週間ごとに腹腔内、皮下、静脈内あるいは筋肉内に追加免疫を2~10回程度反復して行う。免疫用のマウスとしてはBALB/c系マウスの他、BALB/c系マウスと他系マウスとのF1マウスなどを用いることもできる。必要に応じ、抗体価測定系を調製し、抗体価を測定して動物免疫の程度を確認できる。

3. ミエローマ細胞（骨髄腫細胞）の調製

細胞融合に使用される無限増殖可能株（腫瘍細胞株）としては免疫グロブリンを産生しない細胞株から選ぶことができ、例えば P3-NS-1-Ag4-1 (NS-1, Eur. J. Immunol., 6: 511-519, 1976)、SP2/0-Ag14 (SP2, Nature, 276: 269 ~270, 1978)、マウスミエローマ MOPC-21セルライン由来のP3-X63-Ag8-U1 (P3U1, Curr. topics Microbiol. Immunol., 81: 1-7, 1978)、P3-X63-Ag8 (X63, Nature, 256: 495-497, 1975)、P3-X63-Ag8-653 (653, J. Immunol., 123: 1548-1550, 1979)などを用いることができる。8-アザグアニン耐性のマウスミエローマ細胞株はダルベッコMEM 培地 (DMEM培地)、イスコフ改変ダルベッコ培地 (IMDM培地)、RPMI-1640 培地などの細胞培地に、例えばペニシリン、ストレプトマイシン、アミカシンなどの抗生物質、牛胎児血清(FCS)などを加え、さらに8-アザグアニン (例えば5~45 $\mu\text{g}/\text{ml}$)を加えた培地で継代されるが、細胞融合の2~5日前に正常培地で継代して所要数の細胞株を用意することができる。また使用細胞株は、凍結保存株を約37°Cで完全に解凍したのち RPMI-1640培地などの正常培地で3回以上洗浄後、正常培地で培養して所要数の細胞株を用意したものであってもよい。

4. 抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合

上記2. の工程に従い免疫された動物、例えばマウスは最終免疫後、2~5日後にその脾臓が摘出され、それから脾細胞懸濁液を得る。脾細胞の他、生体各所

のリンパ節細胞を得て、それを細胞融合に使用することもできる。こうして得られた脾細胞懸濁液と上記3.の工程に従い得られたミエローマ細胞株を、例えば最小必須培地(MEM培地)、DMEM培地、RPMI-1640 培地などの細胞培地中に置き、細胞融合剤、例えばポリエチレングリコールを添加する。細胞融合剤としては、この他各種当該分野で知られたものを用いることができ、この様なものとしては不活性化したセンダイウイルス(HVJ: Hemagglutinating Virus of Japan)なども挙げられる。好ましくは、例えば30~60%のポリエチレングリコールを0.5 ~2 ml加えることができ、分子量が 1,000~8,000 のポリエチレングリコールを用いることができ、さらに分子量が 1,000~4,000 のポリエチレングリコールがより好ましく使用できる。融合培地中でのポリエチレングリコールの濃度は、例えば30~60%となるようにすることが好ましい。必要に応じ、例えばジメチルスルホキシドなどを少量加え、融合を促進することもできる。融合に使用する脾細胞(リンパ球) : ミエローマ細胞株の割合は、例えば 1:1~20:1とすることが挙げられるが、より好ましくは 4:1~10:1とすることができる。

融合反応を1~10分間行い、次にRPMI-1640 培地などの細胞培地を加える。融合反応処理は複数回行うこともできる。融合反応処理後、遠心などにより細胞を分離した後選択用培地に移す。

5. ハイブリドーマ(融合細胞)の選択及びモノクローン化

選択用培地としては、例えばヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含む、FCS 含有MEM 培地、DMEM培地、IMDM培地、RPMI-1640 培地などの培地、所謂 HAT培地が挙げられる。選択培地交換の方法は、一般的には培養プレートに分注した容量と等容量を翌日加え、その後1~3日ごとに HAT培地で半量ずつ交換するというように処理することができるが、適宜これに変更を加えて行うこともできる。また融合後8~16日目には、アミノプテリンを除いた、所謂HT培地で1~4日ごとに培地交換をすることができる。フィーダーとして、例えばマウス胸腺細胞を使用することもでき、それが好ましい場合がある。

ハイブリドーマの増殖のさかんな培養ウェルの培養上清を、例えば放射免疫分析(RIA)、酵素免疫分析(ELISA)、蛍光免疫分析(FIA)などの測定系、あるいは

蛍光惹起細胞分離装置(FACS)などで、トリプシンあるいはその断片ペプチドを抗原として用いたり、あるいは標識抗マウス抗体を用いて目的抗体を測定するなどして、スクリーニングしたりする。

目的抗体を産生しているハイブリドーマをクローニングする。クローニングは、寒天培地中でコロニーをピック・アップするか、あるいは限界希釈法によりなされうる。限界希釈法でより好ましく行うことができる。クローニングは複数回行うことが好ましい。

6. モノクローナル抗体の製造

得られたハイブリドーマ株は、FCS 含有または FCSを含まないMEM 培地、DMEM 培地、IMDM培地、RPMI-1640 培地などの適当な増殖用培地中で培養し、その培地上清から所望のモノクローナル抗体を得ることが出来る。大量の抗体を得るためには、ハイブリドーマを腹水化することが挙げられる。この場合ミエローマ細胞由来の動物と同系の組織適合性動物の腹腔内に各ハイブリドーマを移植し、増殖させるか、あるいは例えばヌード・マウスなどに各ハイブリドーマを移植し、増殖させ、該動物の腹水中に産生されたモノクローナル抗体を回収して得ることが出来る。動物はハイブリドーマの移植に先立ち、プリスタン (2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン) などの鉱物油を腹腔内投与しておくことができ、その処理後、ハイブリドーマを増殖させ、腹水を採取することもできる。腹水液はそのまま、あるいは従来公知の方法、例えば硫酸アンモニウム沈殿法などの塩析、セファデックスなどによるゲルろ過法、イオン交換クロマトグラフィー法、電気泳動法、透析、限外ろ過法、アフィニティー・クロマトグラフィー法、高速液体クロマトグラフィー法などにより精製してモノクローナル抗体として用いることができる。好ましくは、モノクローナル抗体を含有する腹水は、硫酸分画した後、DEAE-セファロースの如き、陰イオン交換ゲル及びプロテインAカラムの如きアフィニティー・カラムなどで処理し精製分離処理できる。特に好ましくは抗原又は抗原断片 (例えば合成ペプチド、組換え抗原タンパク質あるいはペプチド、抗体が特異的に認識する部位など) を固定化したアフィニティー・クロマトグラフィー、プロテインAを固定化したアフィニティー・クロマトグラフィーなどが挙げ

られる。

またこうして大量に得られた抗体の配列を決定したり、ハイブリドーマ株から得られた抗体をコードする核酸配列を利用して、遺伝子組換え技術により抗体を作製することも可能である。

さらにこれら抗体をトリプシン、パパイン、ペプシンなどの酵素により処理して、場合により還元して得られるFab、Fab'、F(ab')₂といった抗体フラグメントにして使用してもよい。

標識物を付与する抗体としては、IgG画分、更にはペプシン消化後還元して得られる特異的結合部Fab'を用いることができる。これらの場合の標識物の例としては、下記するように酵素（ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼあるいはβ-D-ガラクトシダーゼなど）、化学物質、蛍光物質あるいは放射性同位元素などがある。

本発明での検知・測定は、免疫凝集反応によっても行うことができ、例えばラテックス粒子に抗体を担持させ免疫反応させることができる。また、イムノ染色、例えば組織あるいは細胞染色、イムノアッセイ、例えば競合型イムノアッセイまたは非競合型イムノアッセイで行うことができ、ラジオイムノアッセイ、ELISAなどを用いることができ、B-F分離を行ってもよいし、あるいは行わないでその測定を行うことができる。好ましくは放射免疫測定法や酵素免疫測定法であり、さらにサンドイッチ型アッセイが挙げられる。例えばサンドイッチ型アッセイでは、トリプシンに対する抗体の一方を検出可能に標識化する。同じ抗原を認識できる他の抗体を固相に固定化する。

検体と標識化抗体及び固相化抗体を必要に応じ順次反応させるためインキュベーション処理し、ここで非結合抗体を分離後、標識物を測定する。測定された標識の量は抗原、すなわちトリプシンの量と比例する。このアッセイでは、不溶化抗体や、標識化抗体の添加の順序に応じて同時サンドイッチ型アッセイ、フォワード (forward) サンドイッチ型アッセイあるいは逆サンドイッチ型アッセイなどと呼ばれる。例えば洗浄、攪拌、震盪、ろ過あるいは抗原の予備抽出等は、特定の状況のもとでそれら測定工程の中で適宜採用される。特定の試薬、緩衝液等の濃度、温度あるいはインキュベーション処理時間などのその他の測定条件は、検

体中の抗原の濃度、検体試料の性質等の要素に従い変えることができる。当業者は通常の実験法を用いながら各測定に対して有効な最適の条件を適宜選定して測定を行うことができる。

抗原あるいは抗体を固相化できる多くの担体が知られており、本発明ではそれらから適宜選んで用いることができる。担体としては、抗原抗体反応などに使用されるものが種々知られており、本発明においても勿論これらの公知のものの中から選んで使用できる。特に好適に使用されるものとしては、例えばガラス、例えば活性化ガラス、多孔質ガラス、シリカゲル、シリカーアルミナ、アルミナ、磁化鉄、磁化合金などの無機材料、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリフッ化ビニリデン、ポリ酢酸ビニル、ポリメタクリレート、ポリスチレン、スチレンーブタジエン共重合体、ポリアクリルアミド、架橋ポリアクリルアミド、スチレンーメタクリレート共重合体、ポリグリシジルメタクリレート、アクロレインーエチレングリコールジメタクリレート共重合体など、架橋化アルブミン、コラーゲン、ゼラチン、デキストラン、アガロース、架橋アガロース、セルロース、微結晶セルロース、カルボキシメチルセルロース、セルロースアセテートなどの天然または変成セルロース、架橋デキストラン、ナイロンなどのポリアミド、ポリウレタン、ポリエポキシ樹脂などの有機高分子物質、さらにそれらを乳化重合して得られたもの、細胞、赤血球などで、必要に応じ、シランカップリング剤などで官能性基を導入してあるものが挙げられる。

さらに、ろ紙、ビーズ、試験容器の内壁、例えば試験管、タイタープレート、タイターウェル、ガラスセル、合成樹脂製セルなどの合成材料からなるセル、ガラス棒、合成材料からなる棒、末端を太くしたりあるいは細くしたりした棒、末端に丸い突起をつけたりあるいは扁平な突起をつけた棒、薄板状にした棒などの固体物質（物体）の表面などが挙げられる。

これら担体へは、抗体を結合させることができ、好ましくは本発明で得られるトリプシンに対し特異的に反応するモノクローナル抗体を結合させることができる。担体とこれら抗原抗体反応に関与するものとの結合は、吸着などの物理的な手法、あるいは縮合剤などを用いたり、活性化されたものなどを用いたりする化学的な方法、さらには相互の化学的な結合反応を利用した手法などにより行うこ

とが出来る。

標識としては、酵素、酵素基質、酵素インヒビター、補欠分子類、補酵素、酵素前駆体、アポ酵素、蛍光物質、色素物質、化学ルミネッセンス化合物、発光物質、発色物質、磁気物質、金属粒子、例えば金コロイドなどのコロイド状金属粒子、コロイド状粒子、マイクロパーティクル、放射性物質、ビオチンなどを挙げる事ができる。酵素としては、脱水素酵素、還元酵素、酸化酵素などの酸化還元酵素、例えばアミノ基、カルボキシル基、メチル基、アシル基、リン酸基などを転移するのを触媒する転移酵素、例えばエステル結合、グリコシド結合、エーテル結合、ペプチド結合などを加水分解する加水分解酵素、リアーゼ、イソメラーゼ、リガーゼなどを挙げる事ができる。酵素は複数の酵素を複合的に用いて検知に利用することもできる。例えば酵素的サイクリングを利用することもできる。

コロイド状金属粒子標識としては、目視可能な信号を与えるものが好ましく使用でき、それは金属、金属酸化物、金属水酸化物、金属塩などからなる粒子であってよく、該粒子は純粋な金属からなるものでも、金属化合物あるいは混合物からなるものであってもよいし、また金属又は金属化合物などをコーティングした合成樹脂などの高分子物質からなる核を有するものであってもよい。適当な金属あるいは金属化合物としては、例えば、金、銀、プラチナ、銅などの金属、水酸化銀、臭化銀、ヨウ化銀、酸化鉄、水酸化鉄、水酸化アルミニウム、酸化アルミニウム、水酸化クロム、硫酸銅、硫酸水銀、二酸化チタンなどの金属化合物などが挙げられる。好ましいコロイド状金属粒子標識としては、金コロイド、銀コロイド、酸化鉄コロイドなどが挙げられる。また標識としてのコロイド状粒子としては、セレン、テルル、硫黄などの非金属粒子であることもでき、さらには染料のゾル粒子であることもでき、比較的微量で視覚的に検知可能なシグナルを与えるものが好適に使用できる。

コロイド状粒子、例えばコロイド状金属粒子は、当該分野で一般に知られた方法に従って製造することができる。例えば、金コロイド粒子の製造方法は、Nature, 241, 20, (1973) などに開示されており、塩化金の溶液を加熱沸騰させ、そこにクエン酸ナトリウムなどの溶液を混合して、塩化金を還元するなどして行う

ことができ、上記二つの化合物を混合するとすぐに該沸騰溶液は薄い青色に変色して核形成の開始を示し、その後青色が赤色がかった色に変化して単一分散の粒子の形成を示すようになる。得られる粒子の大きさは、クエン酸ナトリウム溶液などの濃度を変化させることにより調節することができる。金属粒子標識で与えられる視覚的に検知可能なシグナルは、金属粒子の種類や粒子径によって異なる。例えば、金コロイド標識の場合、ゾルの粒径に依存して、オレンジから赤紫にわたる色を生ずるが、そのコロイド粒子の粒径を適宜選択して最適な検出・測定感度が得られるようにすることができる。

代表的な放射性物質の標識用同位体元素としては、 $[^{32}\text{P}]$, $[^{125}\text{I}]$, $[^{131}\text{I}]$, $[^3\text{H}]$, $[^{14}\text{C}]$, $[^{35}\text{S}]$ などが挙げられる。

代表的な酵素標識としては、西洋ワサビペルオキシダーゼなどのペルオキシダーゼ、大腸菌 β -D-ガラクトシダーゼなどのガラクトシダーゼ、マレエート・デヒドロゲナーゼ、グルコース-6-フォスフェート・デヒドロゲナーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコアミラーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、カタラーゼ、ウシ小腸アルカリホスファターゼ、大腸菌アルカリホスファターゼなどのアルカリフォスファターゼなどが挙げられる。

アルカリホスファターゼを用いた場合、4-メチルウンベリフェリルフォスフェートなどのウンベリフェロン誘導体、ニトロフェニルホスフェートなどのリン酸化フェノール誘導体、NADPを利用した酵素的サイクリング系、ルシフェリン誘導体、ジオキセタン誘導体などの基質を使用したりして、生ずる蛍光、発光などにより測定できる。ルシフェリン、ルシフェラーゼ系を利用したりすることもできる。

カタラーゼを用いた場合、過酸化水素と反応して酸素を生成するので、その酸素を電極などで検知することもできる。電極としてはガラス電極、難溶性塩膜を用いるイオン電極、液膜型電極、高分子膜電極などであることもできる。

酵素標識は、ビオチン標識体と酵素標識アビジン（ストレプトアビジン）に置き換えることも可能である。標識は、複数の異なった種類の標識を使用することもできる。こうした場合、複数の測定を連続的に、あるいは非連続的に、そして同時にあるいは別々に行うことを可能にすることもできる。

本発明においては、信号の形成に4-ヒドロキシフェニル酢酸、1,2-フェニレンジアミン、テトラメチルベンジジンなどと西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ、ウンベリフェリルガラクトシド、ニトロフェニルガラクトシドなどと β -D-ガラクトシダーゼ、グルコース-6-リン酸・デヒドロゲナーゼなどの酵素試薬の組合わせも利用でき、ヒドロキノン、ヒドロキシベンゾキノン、ヒドロキシアントラキノンなどのキノール化合物、リボ酸、グルタチオンなどのチオール化合物、フェノール誘導体、フェロセン誘導体などを酵素などの働きで形成しうるものが使用できる。

蛍光物質あるいは化学ルミネッセンス化合物としては、フルオレセインイソチオシアネート、例えばローダミンBイソチオシアネート、テトラメチルローダミンイソチオシアネートなどのローダミン誘導体、ダンシルクロリド、ダンシルフルオリド、フルオレスカミン、フィコビリプロテイン、アクリジニウム塩、ルミフェリン、ルシフェラーゼ、エクォリンなどのルミノール、イミダゾール、シュウ酸エステル、希土類キレート化合物、クマリン誘導体などが挙げられる。

標識するには、チオール基とマレイミド基の反応、ピリジルジスルフィド基とチオール基の反応、アミノ基とアルデヒド基の反応などを利用して行うことができ、公知の方法あるいは当該分野の当業者が容易になしうる方法、さらにはそれらを修飾した方法の中から適宜選択して適用できる。また上記免疫原性複合体作製に使用されることのできる縮合剤、担体との結合に使用されることのできる縮合剤などを用いることができる。

縮合剤としては、例えばグルタルアルデヒド、ヘキサメチレンジイソシアネート、ヘキサメチレンジイソチオシアネート、N,N'-ポリメチレンビスヨードアセトアミド、N,N'-エチレンビスマレイミド、エチレングリコールビススクシニミジルスクシネート、ビスジアゾベンジジン、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド、スクシンイミジル 3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPDP)、N-スクシンイミジル 4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(SMCC)、N-スルホスクシンイミジル 4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート、N-スクシンイミジル (4-ヨードアセチル)アミノベンゾエート、N-スクシンイミジル 4-(1-マレイミドフェニル)ブチ

レート、N-(ϵ -マレイミドカプロイルオキシ)コハク酸イミド (EMCS)、イミノチオラン、S-アセチルメルカプトコハク酸無水物、メチル-3-(4'-ジチオピリジル)プロピオンイミデート、メチル-4-メルカプトブチリルイミデート、メチル-3-メルカプトプロピオンイミデート、N-スクシンイミジル-S-アセチルメルカプトアセテートなどが挙げられる。

本発明の測定法によれば、測定すべき物質を酵素などで標識したモノクローナル抗体などの標識抗体試薬と、担体に結合された抗体とを順次反応させることができるし、同時に反応させることもできる。試薬を加える順序は選ばれた担体系の型により異なる。感作されたプラスチックなどのビーズを用いた場合には、酵素などで標識したモノクローナル抗体などの標識抗体試薬を測定すべき物質を含む検体試料と共に最初適当な試験管中に一緒に入れ、その後該感作されたプラスチックなどのビーズを加えることにより測定を行うことができる。

本発明の定量法においては、免疫学的測定法が用いられるが、その際の固相担体としては、抗体などタンパク質を良く吸着するポリスチレン製、ポリカーボネイト製、ポリプロピレン製あるいはポリビニル製のボール、マイクロプレート、スティック、微粒子あるいは試験管などの種々の材料および形態を任意に選択し、使用することができる。

測定にあたっては至適pH、例えばpH約4～9に保つように適当な緩衝液系中で行うことができる。特に適切な緩衝剤としては、例えばアセテート緩衝剤、クエン酸塩緩衝剤、フォスフェート緩衝剤、トリス緩衝剤、トリエタノールアミン緩衝剤、ボレート緩衝剤、グリシン緩衝剤、炭酸塩緩衝剤、トリス-塩酸緩衝剤などが挙げられる。緩衝剤は互いに任意の割合で混合して用いることができる。抗原抗体反応は約0℃～60℃の間の温度で行うことが好ましい。

酵素などで標識されたモノクローナル抗体などの抗体試薬及び担体に結合せしめられた抗体試薬、さらには測定すべき物質のインキュベーション処理は、平衡に達するまで行うことができるが、抗原抗体反応の平衡が達成されるよりもずっと早い時点で固相と液相とを分離して限定されたインキュベーション処理の後に反応を止めることができ、液相又は固相のいずれかにおける酵素などの標識の存

在の程度を測ることができる。測定操作は、自動化された測定装置を用いて行うことが可能であり、ルミネセンス・ディテクター、ホト・ディテクターなどを使用して基質が酵素の作用で変換されて生ずる表示シグナルを検知して測定することもできる。

免疫学的測定は、家庭、診療所、診察室等での使用など、熟練を要さない、そして簡易な適用が可能で、早急に分析結果を確実に得ることができるように構成して行うことができる。例えば、(a) 乾燥キャリア（例えば、多孔質キャリアなど）に液体試料（あるいは湿潤試料）が適用され得るように配置され、(b)(i) 湿潤状態において該キャリア内部を自由に移動し得る、検体に対して特異結合性の標識された試薬と、(ii) キャリア材料上の検出区域に永久的に固定化されており、従って湿潤状態でも移動しない、同検体に対して特異結合性の無標識試薬とを含んでおり、(c) 標識された試薬(i) と検出区域とは相互に空間的に分離されており、適用された液体試料（あるいは湿潤試料）が標識された試薬(i) を溶出化して後に検出区域に浸透するように該標識された試薬(i) と検出区域との位置関係が決定されており、さらに該標識された試薬(i) が検出区域において結合された程度などの結果を観察できる手段を含有している試験系（例えば、分析試験装置）が挙げられる。該試験系（例えば、分析試験装置）の好ましいものとしては、一般にラテラル フロー装置として知られたものが挙げられ、例えば、特許第 2705767 号に開示されたようなものあるいはそれを参考にして改変されて構成されたものが挙げられる。

代表的な該試験系の例では、標識された試薬(i) は乾燥キャリア（例えば、多孔質キャリアなど）の第一区域に含まれており、第一区域から空間的に区別される検出区域に無標識試薬が固定化されており、キャリア（例えば、多孔質キャリアなど）に適用された液体試料（あるいは湿潤試料）が第一区域から検出区域に浸透するように二つの区域が配置されるようになっている。こうして該試験系（例えば、分析試験装置）では、該標識された試薬(i) と該無標識試薬(ii) とは共に「サンドイッチ」アッセイ又は「競合」アッセイに参加できる試薬となってい

る。別の面では、該試験系（例えば、装置）を用い、検体を含有する考えられる水性などの液体試料をキャリア（例えば、多孔質キャリアなど）に適用し、試料を毛細管現象などによってキャリア（例えば、多孔質キャリアなど）を通して第一区域から第二区域へと浸透せしめ、試料と共に標識された試薬(i)を第一区域から第二区域へと移動せしめ、標識された試薬(i)が第二区域で結合された程度などの結果を観察することにより、試料中に検体が存在するか否かなどを判定する方法が提供される。

例えば、標識された試薬(i)及び無標識試薬(ii)として、それぞれイヌトリプシンに対するモノクローナル抗体を使用すると、標識された試薬(i)と試料中の検知すべき抗原と固定化された無標識試薬とが共同して「サンドイッチ」反応を生じ、その結果、試料中に検知すべき抗原が存在する場合は、第二区域で標識された試薬が結合されることになる。別の態様では、例えば、標識された試薬として、標識されたイヌトリプシンなどの標識抗原そのもの、あるいは検知すべき抗原の類縁物などを使用し、キャリア（例えば、多孔質キャリアなど）を通して、該標識されたイヌトリプシンなどの標識抗原あるいは検知すべき抗原の類縁物などを第二区域へ移動すると、固定化された無標識試薬と結合することになる。試料中に検知すべき抗原が存在すれば、それがこの結合反応において標識された試薬と競合する。このような競合の結果、第二区域で結合される標識された試薬の量が減少し、その結果、試料中に検知すべき抗原が存在しなかった場合と比較して第二区域において観察される信号の程度が弱くなる。

該試験系の好ましい例では、液体試料（あるいは湿潤試料）を受容し、それをキャリア（例えば、多孔質キャリアなど）に放出させる機能を有する吸湿性試料受容部材を介して該キャリア（例えば、多孔質キャリアなど）に液体試料（あるいは湿潤試料）を適用し得るように構成することができる。こうした場合、該吸湿性試料受容部材に乾燥状態で標識された試薬(i)を含有せしめて置くことができる。該受容部材は、液体を急速に吸収できるものが好ましく、そうした性状を有するものであれば、吸湿性材料、多孔質材料、繊維質材料などの任意の材料で形成することができる、材料の孔の多くは一方向性あるいは多方向性又は全方向

性の何れであってもよい。該一方向性の材料とは、気孔又は繊維の全部あるいは大部分が部材の軸に平行に通っているものを意味してよく、材料が多方向性の孔部などを有していると、その部材は非晶質のスポンジ状の構造を有する。該材料としては、多孔質のプラスチック材料を使用することができ、例えば、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリフッ化ビニリデン、エチレン酢酸ビニル、アクリロニトリル、ポリテトラフルオロエチレンなどから構成されたものが挙げられる。該受容部材は、製造の段階で界面活性剤で予め処理しておくことができる。界面活性剤で処理しておく、と、部材の固有の疎水性を低減でき、湿潤試料を速やかに吸収したり、移送したりできて好ましい。該受容部材は、その他、紙やニトロセルロースなどのセルロース材料で形成することもできる。

本試験系では、標識はその存在を容易に検出できる形態のものであれば如何なるものも好ましく使用でき、好適には直接標識、すなわち、その自然状態にある時に肉眼的に検出できたり、あるいは光学フィルターを使用したり及び／又は紫外光などで励起させて蛍光などを生ぜしめるなどのことで容易に観察できるようなものとすることが好ましく、例えば、金コロイドなどのコロイド状金属粒子、染料コロイド状粒子、着色ラテックス粒子などのマイクロパーティクルなどが挙げられる。該キャリアとしては、通常多孔質キャリアが使用され、例えば、ニトロセルロースなどが好適に使用できるが、濾紙など天然及び合成ポリマー及びその誘導体から選択することができる。該ポリマー及びその誘導体の例としては、上記担体として挙げられたものなどがある。該キャリアは、例えば、ストリップあるいはシートの形状として好ましく使用できる。該キャリアを帯状あるいはシート状の形状とした場合、好ましくは試薬は空間的に別個の区域に塗布され、液体試料（あるいは湿潤試料）はシート又は帯状片の片側あるいは一端部から他方へ浸透させる。またキャリア材は、任意にプラスチックシートなどの透明な不透湿性材料層で裏打ちされていることができる。

本試験系では、「対照」区域を設けておくことができる。該対照区域は、該試験系（例えば、分析試験装置）の動作あるいは操作が完了したこと及び／又は正常に達成できたことを使用者に示す信号を与えるように構成できる。例えば、第一区域からの標識された抗体と結合することのできる抗体などの結合試薬を該対照区域に含むようにして置くと、試料などが浸透したことを確認できる。例えば、標識された抗体としてマウス由来のハイブリドーマの産生したモノクローナル抗体を使用した場合、該対照区域に「抗マウス抗体」を含むようにしておくなどである。該対照区域には、その他、湿潤した時に変色あるいは発色するような試薬など、適宜適当な試薬、手段を選んで適用することができる。

試薬は様々な方法でキャリア材料に塗布あるいは保持せしめることができ、例えば、液体試薬を小型のシリンジ、マイクロピペット、制御装置付きペン状器具、インク噴射印刷装置などでキャリア材料に塗ったり、印刷したり、含浸させたりして適用できる。

抗原抗体反応においては、それぞれ用いられる試薬、測定すべき物質、さらには酵素などの標識を安定化したり、抗原抗体反応自体を安定化するように適切な手段を講ずることができる。さらに、非特異的な反応を除去し、阻害的に働く影響を減らしたり、あるいは測定反応を活性化したりするため、タンパク質、安定化剤、界面活性化剤、キレート化剤などをインキュベーション溶液中加入することもできる。キレート化剤としては、エチレンジアミン四酢酸塩(EDTA)がより好ましい。

当該分野で普通に採用されていたりあるいは当業者に知られた非特異的結合反応を防ぐためのブロッキング処理を施してもよく、例えば、哺乳動物などの正常血清タンパク質、アルブミン、スキムミルク、乳発酵物質、コラーゲン、ゼラチンなどで処理することができる。非特異的結合反応を防ぐ目的である限り、それらの方法は特に限定されず用いることが出来る。

本発明の測定方法で測定される試料としては、あらゆる形態の溶液やコロイド溶液、非流体試料などが使用しうるが、好ましくは生物由来の試料、例えば血液、血清、血漿、関節液、唾液、尿、糞、脾臓、脾液、その他の体液、細胞培養液

、組織培養液、組織ホモジュネート、生検試料、組織、細胞などが挙げられる。

これら個々の免疫学的測定法を本発明の測定方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて、天然のトリプシンあるいはそれと実質的に同等な活性を有するイヌ由来のタンパク質に関連した測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる〔例えば、入江 寛編、「ラジオイムノアッセイ」、講談社、昭和49年発行；入江 寛編、「続ラジオイムノアッセイ」、講談社、昭和54年発行；石川栄治ら編、「酵素免疫測定法」、医学書院、昭和53年発行；石川栄治ら編、「酵素免疫測定法」（第2版）、医学書院、昭和57年発行；石川栄治ら編、「酵素免疫測定法」（第3版）、医学書院、昭和62年発行；「Methods in Enzymology」Vol. 70 (Immunochemical Techniques (Part A))；同書 Vol. 73 (Immunochemical Techniques (Part B))；同書 Vol. 74 (Immunochemical Techniques (Part C))；同書 Vol. 84 (Immunochemical Techniques (Part D: Selected Immunoassays))；同書 Vol. 92 (Immunochemical Techniques (Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))；同書 Vol. 121 (Immunochemical Techniques (Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies))（以上、Academic Press社 (USA)発行）など参照〕。

こうして典型的には本発明の目的は、トリプシンに対するモノクローナル抗体及び固相担体用としてトリプシンに対するモノクローナル抗体を用い、あるいはさらに必要に応じ、トリプシンに対する阻害物質を用い、被検試料中の遊離の前駆体や活性型トリプシンを分別定量する優れた方法及びその為の試薬キットを提供することにある。本発明はこうした遊離の前駆体や活性型トリプシンを分別定量することのできる試薬キットのうちの各試薬をすべてその実施態様のうちに含むと理解される。さらに本発明の目的は、上記定量法を用いて遊離の前駆体や活性型トリプシンを分別定量することにより、膵臓疾患などをモニターし得る方法並びに試薬あるいは診断剤を提供することにある。したがって、医学的・生理学的分野における上記試薬の各種利用、膵臓を含めたイヌなどの動物の細胞・組織の研究・解析・測定などの目的で上記試薬を使用することはすべて本発明のその

実施態様のうちに含まれると理解される。

本発明の前述した種々の態様を利用することにより、イヌの急性膵炎、慢性膵炎、膵癌、膵外分泌不全などの膵臓疾患、腎不全などの内蔵疾患などの病気あるいは疾患、イヌの健康度の診断等に関わる研究に有用な検査・測定の手段として、あるいはその他の医学的生理学的用途に適用される種々の技術手段を提供することができる。

上記したように本発明ではイヌのカチオニック トリプシンを免疫原として用いイヌトリプシンに対するモノクローナル抗体を得ているが、このようにカチオニック分子種に着目したモノクローナル抗体の作製は全く新規なもので、同様にヒトについてもカチオニック トリプシンを免疫原として用いそれに特異的に免疫反応するモノクローナル抗体を作製でき、分別的なトリプシン及び／又はトリプシン様免疫反応物質の免疫学的測定を達成できる。なお、ヒト カチオニック

トリプシンとしては、ヒト膵液から、例えばBiochemistry, Vol. 8, No. 7, pp. 2884-2889, 1969 に記載の方法に準じて分離精製して得たものを使用できる。以下に実施例を掲げ、本発明を具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されず、本明細書の思想に基づく様々な実施形態が可能であることは理解されるべきである。なお、明細書及び図面において、用語は、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによるか、あるいは当該分野において慣用的に使用される用語の意味に基づくものである。

後述の実施例2(g)に記載の抗トリプシンモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ:004-203は、平成10年7月28日（原寄託日）から茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号 305-8566）の通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（NIBH）に寄託されており（受託番号 FERM P-16914）、平成11年07月30日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求がなされ、受託番号FERM BP-6808としてNIBHに保管されている。同様に、後述の実施例2(g)に記載の抗トリプシンモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ:005-201は、平成10年7月28日からNIBHに受託番号 FERM P-16915 として寄託されている。また、抗トリプシンモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ:008-207及び009-303 は、平成

11年3月9日（原寄託日）からNIBHにそれぞれ寄託されており（受託番号 FERM P-17290 及びFERM P-17291）、平成11年07月26日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求がなされ、それぞれ受託番号FERM BP-6795及びFERM BP-6796としてNIBHに保管されている。

実施例

以下に実施例を挙げ、本発明を具体的に説明するが、本発明は実施例に限定されること無く様々な態様が含まれることは理解されるべきである。

実施例 1：イヌトリプシンの精製

David et al.の報告（Biochem. Soc. Trans., Vol.11, No.4, 603rd MEETING, LIVERPOOL, PP.351, 1983）に記載の方法を基本法として用い、ヒトのトリプシン精製法、例えば、Biochemistry, Vol.8, No.7, pp.2884-2889, 1969 に記載の方法、ウシのトリプシン精製法、例えば、Sidney P. Colowick and Nathan O. Kaplan (Ed.), Methods in Enzymology, Vol.2 "Preparation and Assay of Enzymes", 1955, Academic Press (USA)に記載の方法を参考にして改変した方法で、イヌの膵臓よりイヌトリプシンを単離精製した。

イヌの膵臓（27 g）に0.125 N の硫酸（150 ml）を加え、ブレンダーでホモジネートした後、4 °Cで18時間インキュベーション処理をした。次に遠心処理（1500×g）し、上清（1）を得た。得られた沈殿物には0.125 N の硫酸（50 ml）を加え、ブレンダーでホモジネートした後、遠心処理（1500×g）し、上清（2）を得た。こうして得られた上清（1）及び（2）を一緒にした抽出液（185 ml）中に硫酸アンモニウム（19.6 g）を加えて、硫酸アンモニウムの最終濃度を 0.8 Mとした。混合物を4 °Cで24時間インキュベーション処理をした後、遠心処理（23,000×g）し、沈殿と上清（a）を分けた。こうして得られた沈殿には 0.8 M硫酸アンモニウム（40 ml）を加えて、沈殿をよくほぐし、次に遠心処理（23,000×g）し、沈殿と上清（b）を分けた。得られた上清（a）及び（b）を一緒にした液（220 ml）に硫酸アンモニウム（64 g）を加えて、硫酸アンモニウムの最終濃度を 3.0 Mとした。混

合物を4℃で24時間インキュベーション処理をした後、遠心処理 (23,000×g) し、沈殿と上清を分けた。得られた沈殿に 3.0 M硫酸アンモニウム (60 ml)を加えて、沈殿をよくほぐし、次に遠心処理 (23,000×g) し、沈殿と上清を分けた。

こうして得られた沈殿を蒸留水 (10 ml)に溶解し、1 mM塩酸で透析し、次いで粗製酵素サンプル液を凍結乾燥物 (0.4 g)とし、-80℃で次の精製処理を行うまで保存した。

粗製酵素サンプルの凍結乾燥物 (0.4 g)を 10 mlの塩溶液 (0.2 M NaCl/0.05 M CaCl₂, pH 2.6)でもって溶解した。このサンプル液をゲル濾過にかけて精製処理した。ゲル濾過は、セファデックス (Sephadex) G-75 (ファルマシア, 3.8 cm² ×90 cm)のカラムを用い、移動相: 0.2 M NaCl/0.05 M CaCl₂, pH 2.6、流速: 12 ml/hr、そしてフラクション: 5 ml/ 本の条件で行い、各フラクションの吸光度A₂₈₀と活性を測定した。活性測定は、小試験管に1.7 mlの2 mM CaCl₂/0.05 M Tris-HCl, pH 8.0を入れ、そこに溶出した各サンプルを適当に希釈したものを100 μl ずつ入れ、次に200 μl の1 mM ベンゾイルアルギニンエチルエーテル (Benzoyl arginine ethyl ether; BAEE) を添加して、反応を開始せしめ、吸光度A₂₅₃を測定して経時的变化を観察した。なお、0.001/min. =1 BAEE Unitで計算した。

活性の認められたフラクション No.36~42をまとめて一緒にし、次に1 mM塩酸で透析し、次いで透析後のサンプル液を凍結乾燥物 (0.2 g)とした。

該凍結乾燥サンプル (0.2 g)を 5 ml の緩衝液 (4 mM CaCl₂/0.1 M Tris-HCl, pH 8.0)でもって溶解した。該サンプル液を4℃で15時間インキュベーション処理をした後、蒸留水で2 倍に希釈した。得られたサンプル液 (9.6 ml) をアフィニティークロマトグラフィーにかけて精製処理した。アフィニティークロマトグラフィーは、ベンズアミジン セファロース (Benzamidine Sepharose) 6B (ファルマシア, 0.8 cm² ×12 cm)のカラムを用い、移動相: 1) 2 mM CaCl₂/0.05 M Tris-HCl, pH 8.0; 2) 2 mM CaCl₂/0.05 M Tris-HCl, pH 8.0 - 0.5 M NaCl; 3) 2 mM CaCl₂/0.05 M Sodium Acetate, pH 4.25;及び 4) 2 mM CaCl₂/0.05 M So

dium Acetate, pH 3.25、流速: 24 ml/hr、そしてフラクション: 2 ml/ 本の条件で行い、各フラクションの吸光度 A_{280} と活性を測定した。活性測定は、小試験管に1.7 mlの2 mM CaCl_2 /0.05 M Tris-HCl, pH 8.0を入れ、そこに溶出した各サンプルを適当に希釈したものを100 μl ずつ入れ、次に200 μl の1 mM ベンゾイルアルギニンエチルエーテル (Benzoyl arginine ethyl ether; BAEE) を添加して、反応を開始せしめ、吸光度 A_{280} を測定して経時的变化を観察した。なお、0.001/min. =1 BAEE Unitで計算した。

活性の認められたフラクション No. 80~93及びNo. 111~121 をそれぞれまとめて一緒にし、1 mM塩酸で透析した。透析後、各サンプルは凍結乾燥物とした。フラクション No. 80~93の活性は、Cationic Trypsinであり、フラクション No. 111 ~121 の活性は、Anionic Trypsin であった。

Anionic Trypsin (20 mg) は、 -80°C で次の使用時まで保存した。

得られたCationic Trypsin (17 mg)の内、7 mgのサンプルを0.5 mlの2 mM CaCl_2 /0.05 M Tris-HCl, pH 8.0 - 0.5 M NaCl でもって溶解し、得られたサンプル液をアフィニティークロマトグラフィーにかけて精製処理した。アフィニティークロマトグラフィーは、ベンズアミジン セファロース 6B (ファルマシア, 0.8 $\text{cm}^2 \times 12 \text{ cm}$)のカラムを用い、移動相: 1) 2 mM CaCl_2 /0.05 M Tris-HCl, pH 8.0 - 0.5 M NaCl; 2) 2 mM CaCl_2 /0.05 M Sodium Acetate, pH 4.25; 及び 3) 2 mM CaCl_2 /0.05 M Sodium Acetate, pH 3.25、流速: 24 ml/hr、そしてフラクション: 2 ml/ 本の条件で行った。移動相: 2)での溶出画分をまとめて一緒にし、1 mM塩酸で透析した。透析後、サンプルは凍結乾燥物 (6.2 mg) とし、 -80°C で次の使用時まで保存した。N 末端アミノ酸分析を行ったところ、Ile-Val-Gly-Gly-Tyr-Thr であり、犬Cationic Trypsinと同じであった。その配列は、配列表の配列番号: 2に示されている犬 Cationic Trypsinogen のアミノ酸配列のIle² ~Thr²⁹ に対応するものである。配列表の配列番号: 1には犬 Anionic Trypsinogenのアミノ酸配列が示されている。上記Anionic Trypsin のサンプルについてもN 末端アミノ酸分析を行ったところ、同様な結果が得られた。

実施例 2 : モノクローナル抗体の調製

(a) 抗体産生細胞の調製

実施例 1 で調製したCationic Trypsinを抗原として用いる。抗原を100 μ g/100 μ l となるようにリン酸緩衝生理食塩液(PBS)(0.1M, pH7.4)で調製し、それを等量の完全フロイントアジュバントと混合し、エマルジョンを調製する。該エマルジョンを 6週令Balb/c雌マウスに腹腔内投与 (100 μ g/200 μ l/匹) し、初回免疫した。10日～2 週間間隔をあけて追加免疫した。この追加免疫では、抗原を100 μ g/100 μ l となるように調製し、それを等量の不完全フロイントアジュバントと混合し、エマルジョンを調製し、該エマルジョンを腹腔内投与 (100 μ g/200 μ l/匹) した。さらに、10日～2 週間間隔をあけて免疫した。必要に応じて、この間隔で免疫を繰り返すこともできる。最終免疫として、抗原を100 μ g/200 μ l となるように調製し、それをそのまま静脈内投与した。その 3 日後に脾臓を摘出し、脾細胞懸濁液を調製した。

免疫は、2 匹のマウスに行った。同様にAnionic Trypsin を抗原として用いて免疫を実施できる。

(b) 抗原ポリペプチドの調製

配列表の配列番号：2 に記載したイヌ カチオニック トリプシンのアミノ酸配列のN末、中央及びC末領域より特徴的な配列を選び、配列番号：3、4 及び 5 の各配列を選択し、合成した。

〔配列番号：3〕

CysLeuIleSerGlyTrpGlyAsnThrGlnSerIleGlyGlnAsnTyrProAspValLeu

(配列表の配列番号：2 のCys¹³⁹～Leu¹⁵⁸の配列)

〔配列番号：4〕

IleValGlyGlyTyrThrCysSerArgAsnSerValProTyrGlnValSerLeuAsnSer

(配列表の配列番号：2 のIle²⁴～Ser⁴³の配列)

〔配列番号：5〕

LeuGlnGlyValValSerTrpGlyAlaGlyCysAlaGlnLysGlyLysProGlyValSer

(配列表の配列番号：2 のLeu²¹⁰～Ser²²⁹の配列)

このポリペプチドをペプチド合成機（ペプチドシンセサイザー 9600、Milligen/Bioscience）を使用して、Fmoc-bop法で合成した。合成したペプチドは μ Bondasphere, C18カラム（Waters）を用いた高速液体クロマトグラフィーにより精製した。同様に、配列表の配列番号：1及び2に示されたアミノ酸配列の中から適当な領域を選択して合成する。

(c) ポリペプチドとBSAの複合体の調製

システイン残基を介してウシ血清アルブミン(BSA)と結合させ、抗原コンジュゲートとした。19.6mgのBSAを1mlの0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)に溶解したものと2.22mgのEMCS (N-(6-maleimidocaproyloxy)-succinimide)を48.3 μ lのジメチルホルムアミドに溶解したものとを混合し、30°C、30分間反応させ、ついで、上記の混合液を0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)で平衡化したPD-10 (Pharmacia)でゲルろ過した。得られたマレイミド結合BSAの濃度は6.22mg/mlであった。前記(b)で合成したそれぞれのポリペプチドを0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)に溶解し、マレイミド結合BSAに対し50倍モル量を混合した。すなわち、1788 nmolのポリペプチドに対し20～40 nmolのマレイミド結合BSAを混合、全量を1mlとして4°C、20時間インキュベートし、BSA-ポリペプチド複合体を調製した。得られたBSA-ポリペプチド複合体のタンパク質濃度は4～6 mg/mlであった。これを0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)で200 μ g/150 μ lとなるように希釈し、150 μ lに分注して-80°Cで凍結保存した。

(d) ポリペプチドBSA複合体による抗体産生細胞の調製

前記(c)で調製したそれぞれのBSA-ポリペプチド複合体200 μ gを完全フロイントアジュバントと共に8週令Balb/c雌マウスに腹腔内投与し、初回免疫した。19日目と34日目に0.1Mリン酸緩衝液(pH7.5)に溶解したBSA-ポリペプチド複合体200 μ gを初回免疫したマウスに腹腔内投与し、追加免疫した。さらに69日目にBSA-ポリペプチド複合体200 μ gを静脈内投与し、最終免疫とした。その3日後に脾臓を摘出し、脾細胞懸濁液を調製した。

免疫は、それぞれのBSA-ポリペプチド複合体に対して2匹のマウスに行った。

(e) 細胞融合

(1) 以下の材料および方法を用いた。

RPMI-1640 培地：RPMI-1640 (Flow Lab.) に重炭酸ナトリウム (24mM)、ピルビン酸ナトリウム (1mM)、ペニシリンG カリウム (50U/ml)、硫酸アミカシン (100 μ g/ml) を加え、ドライアイスでpHを7.2 にし、0.2 μ m 東洋メンブレンフィルターで除菌ろ過した。

NS-1培地：上記RPMI-1640 培地に除菌ろ過したウシ胎児血清 (FCS, M. A. Bioproducts) を15% (v/v) の濃度になるように加えた。

PEG-4000溶液：RPMI-1640 培地にポリエチレングリコール-4000 (PEG-4000, Merk & Co.) を50% (w/w) になるように加えた無血清培地を調製した。

8-アザグアニン耐性ミエローマ細胞SP2 (SP2/0-Ag14) との融合は、Selected Methods in Cellular Immunology, p. 351~371 (ed. B. B. Mishell and S. N. Shiigi), W. H. Freeman and Company (1980) に記載の Oi らの方法を若干改変して行った。

(2) 前記(a) 又は(d) で調製した有核脾細胞 (生細胞率100 %) とミエローマ細胞 (生細胞率100 %) とを 5 : 1 の比率で以下の手順で融合した。それぞれのイヌトリプシン免疫脾細胞懸濁液とミエローマ細胞をそれぞれRPMI-1640培地で洗浄した。次に同じ培地に懸濁し、融合させるために有核脾細胞とミエローマ細胞を混合した。1 $\times 10^8$ ~ 6 $\times 10^8$ 個の有核脾細胞に対し 3 $\times 10^7$ ~ 2 $\times 10^8$ 個のミエローマ細胞を混合した。次に遠心分離により細胞を沈殿させ、上清を完全に吸引除去した。沈殿した細胞に37°Cに加温した50% PEG-4000含有RPMI-1640 培地 (ミエローマ細胞が 3 $\times 10^7$ 個/ml となるよう体積を決定した) を1分間で滴下し、1分間攪拌し、細胞を再懸濁、分散させた。次に添加した50% PEG-4000含有RPMI-1640 培地の2倍体積の37°Cに加温したRPMI-1640 培地を2分間で滴下した。さらに添加した50% PEG-4000含有RPMI-1640 培地の7倍体積のRPMI-1640 培地を2~3分間で常に攪拌しながら滴下し、細胞を分散させた。これを遠心分離し、上清を完全に吸引除去した。次に、ミエローマ細胞が 3 $\times 10^6$ 個/ml となるように37°Cに加温したNS-1培地を、沈殿した細胞に速やかに加え、大きい細胞塊を

注意深くピペティングで分散した。さらに同培地を加えて希釈し、ポリスチレン製96穴マイクロウエルにウエル当りミエローマ細胞が 6.0×10^5 個となるように接種した。細胞を加えた上記マイクロウエルを7%炭酸ガス/93%空気中で温度37°C、湿度100%で培養した。

(f) 選択培地によるハイブリドーマの選択的増殖

(1) 使用した培地は以下の通りである。

HAT 培地：前記 (e) 項(1) で述べたNS-1培地に、更にヒポキサンチン (100 μ M)、アミノプテリン (0.4 μ M) およびチミジン (16 μ M) を加えた。

HT培地：アミノプテリンを除去した以外は上記HAT 培地と同一組成のものである。

(2) 前記 (e) 項の培養開始後翌日 (1日目)、細胞にパスツールピペットでHAT 培地2滴 (約0.1ml) を加える。2、3、5、8日目に培地の半分 (約0.1ml) を新しいHAT 培地で置き換え、11日目に培地の半分以上を新しいHT培地で置き換えた。14日目にハイブリドーマの生育が肉眼にて認められた全ウエルについて、固相-抗体結合テスト法 (ELISA) により陽性ウエルを調べた。

まず、実施例1で精製したアニオン性またはカチオン性トリプシンでポリスチレン製96穴プレートをコートする。例えば、トリプシンを1 μ g/mlとなるように調製し、100 μ l/ウエルとなるように添加する。次に各ウエルを洗浄用PBS (0.05% Tween20 (商品名) 含有) を用いて洗浄して未吸着の抗原を除いた。さらに各ウエルの未コート部分を1% BSAでブロックした。洗浄後、この各ウエルにハイブリドーマの生育が確認されたウエルの上清 100 μ l/ウエルを添加し、37°Cで約1時間静置した。洗浄後、2次抗体として西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) 標識ヤギ抗マウス免疫グロブリン (Cappel) を加え、さらに37°Cで約1時間静置した。洗浄後、基質である過酸化水素と 2,2'-アジノ-ビス (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) を加え、発色の程度をマイクロプレート用吸光度測定機 (MRP-A4、東ソー) を用いて 405nmの吸光度で測定した。

(g) ハイブリドーマのクローニング

上記 (f) 項で得られるトリプシンに対し陽性のウエル中のハイブリドーマを、限界希釈法を用いてモノクローン化した。すなわち、NS-1培地1ml 当りフィーダーとして 10^7 個のマウス胸腺細胞を含むクローニング培地を調製し、96穴マイクロウエルにハイブリドーマをウエル当り 5 個、1 個、0.5 個になるように希釈し、それぞれ36穴、36穴、24穴に加えた。5 日目、12日目に全ウエルに約0.1ml の NS-1培地を追加した。クローニング開始後約 2 週間で、肉眼的に十分なハイブリドーマの生育を認め、コロニー形成陰性ウエルが 50%以上である群について (f) 項に記載したELISA を行った。調べた全ウエルが陽性でない場合、抗体陽性ウエル中のコロニー数が1 個のウエルを 4 ～ 6 個選択し、再クローニングを行った。最終的にそれぞれのトリプシンに対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマが得られた。

(h) モノクローナル抗体のクラス、サブクラスの決定

前述したELISA に従い、トリプシンをコートしたポリスチレン製96穴プレートに、(g) 項で得られたハイブリドーマの上清を加えた。次にPBS で洗浄後、アイソタイプ特異的ウサギ抗マウスIgG 抗体 (Zymed Lab.) を加えた。PBS により洗浄後、西洋わさびペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギIgG (H+L)を加え、基質として過酸化水素および 2,2'-アジノ- ジ (3-エチルベンゾチアゾリン酸) を用いてクラス、サブクラスを決定した。実施例 1 で得られたトリプシンを免疫して得られたモノクローナル抗体産生ハイブリドーマのクローン番号およびサブクラスを表 1 及び 2 に示した。

第1表

| クローン番号 | サブクラス | Cationic Trypsin との反応性 | Anionic Trypsin との反応性 |
|---------|-------------------|---------------------------|--------------------------|
| 004-301 | $\gamma 1/\kappa$ | ++++ | +++ |
| 004-312 | $\gamma 1/\kappa$ | ++++ | +++ |
| 004-203 | $\gamma 1/\kappa$ | ++++ | - |
| 004-214 | $\gamma 1/\kappa$ | ++++ | - |
| 005-201 | $\gamma 1/\kappa$ | ++++ | - |
| 005-202 | $\gamma 1/\kappa$ | ++++ | ± |
| 005-203 | $\gamma 1/\kappa$ | ++++ | + |
| 005-204 | $\gamma 1/\kappa$ | +++ | ± |
| 005-205 | $\gamma 1/\kappa$ | ++++ | + |
| 005-206 | $\gamma 1/\kappa$ | +++ | - |
| 005-208 | $\gamma 1/\kappa$ | ++++ | - |
| 007-202 | $\gamma 1/\kappa$ | +++ | - |
| 007-203 | $\gamma 1/\kappa$ | +++ | - |
| 007-205 | $\gamma 1/\kappa$ | +++ | - |
| 007-206 | μ/κ | +++ | +++ |
| 007-207 | $\gamma 1/\kappa$ | +++ | - |
| 007-209 | $\gamma 1/\kappa$ | +++ | - |

第2表

| クローン番号 | サブクラス | Cationic Trypsin との反応性 | Anionic Trypsin との反応性 |
|---------|--------------------|---------------------------|--------------------------|
| 008-202 | $\gamma 1/\kappa$ | +++ | — |
| 008-204 | $\gamma 1/\kappa$ | +++ | — |
| 008-205 | $\gamma 1/\kappa$ | +++ | — |
| 008-206 | $\gamma 1/\kappa$ | +++ | — |
| 008-207 | $\gamma 1/\kappa$ | +++ | — |
| 009-201 | $\gamma 1/\kappa$ | ++++ | — |
| 009-202 | $\gamma 1/\kappa$ | ++++ | — |
| 009-303 | $\gamma 1/\kappa$ | +++++ | — |
| 009-204 | $\gamma 1/\kappa$ | +++++ | — |
| 009-205 | $\gamma 1/\kappa$ | +++ | — |
| 009-206 | $\gamma 2a/\kappa$ | +++ | — |
| 009-207 | $\gamma 1/\kappa$ | +++ | — |
| 009-209 | $\gamma 1/\kappa$ | +++ | ± |

上記の抗イヌトリプシンモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ:

004-203 は、受託番号 FERM P-16914 として

005-201 は、受託番号 FERM P-16915 として

それぞれ平成10年07月28日からNIBHに寄託されている。そしてハイブリドーマ:

004-203 は、原寄託より平成11年07月30日にブダペスト条約に基づく寄託への移
管請求がなされ、受託番号 FERM BP-6808 としてNIBHに保管されている。さらに

、上記の抗イヌトリプシンモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ:

008-207 は、受託番号 FERM P-17290 として

009-303 は、受託番号 FERM P-17291 として

それぞれ平成11年03月09日からNIBHに寄託されている。そしてこの原寄託より平成11年07月26日にブダペスト条約に基づく寄託への移管請求がなされ、それぞれ受託番号 FERM BP-6795 及び FERM BP-6796 としてNIBHに保管されている。

(i) ハイブリドーマの培養とモノクローナル抗体の精製

得られたハイブリドーマ細胞をNS-1培地で培養し、その上清から濃度10~100 $\mu\text{g/ml}$ のモノクローナル抗体を得ることができた。

また、予め1週間前にプリスタンを腹腔内投与したマウス (Balb/c系、雌、6週齢) に、同じく得られたハイブリドーマ 10^7 個を腹腔内投与し、1~2週間後、腹水中からも 4~7mg/mlのモノクローナル抗体を含む腹水を得ることができた。得られた腹水は40%飽和硫酸アンモニウムで塩析後、たとえば、004-203 抗体は、腹水 16ml をリン酸緩衝生理食塩液(pH7.4) で 2倍希釈し、飽和硫酸アンモニウムを 25.2ml 加え、最終濃度 40%飽和とし、4°Cで一夜インキュベートした。さらに、13500 rpm, 30分間遠心し、沈殿を蒸留水で懸濁し、60mM NaCl/0.03M Tris-HCl(pH8.0) で透析した。DEAE- セファロース (ファルマシア) カラムに通し、非吸着画分を3ml/画分で分取し、リン酸緩衝生理食塩液(pH7.4) で透析した。1.38 mg/mlで 32ml 得られ、-80°Cで保存した。さらに、IgG クラスの抗体をプロテインA アフィゲル (Bio-Rad)に吸着させ、0.1Mクエン酸緩衝液 (pH5.0)で溶出することにより精製することもできる。

実施例 3 : イヌトリプシンに対する反応性

実施例 2 で調製した各モノクローナル抗体のCationic Trypsin及びAnionic Trypsin との反応性は次の通りの方法で試験した。なお、Cationic Trypsin及びAnionic Trypsin は実施例 1 に従いイヌ膵臓より精製したものをを用いた。

96穴マイクロタイトレーションプレート(costar)に100ng のCationic Trypsin又はAnionic Trypsin を加え、4°Cで一晩コートした。1%BSA, 0.1M 塩化ナトリウム及び10mM EDTA 含有30mMリン酸緩衝液(pH7.0, 緩衝液A)を各ウェルに300 μl ずつ加え、4°Cで保存した。これに、抗トリプシンモノクローナル抗体を 1 $\mu\text{g/ml}$ 加えて、37°Cで1時間インキュベートし、さらに抗マウス IgG・IgM・IgA -

HRP 抗体 (KPL) 1 μ g/ml 加え、37°C で 1 時間インキュベートした。次に基質である H_2O_2 及び 2,2'-アジノ-ビス (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) を加え、マイクロプレートリーダー (MRP-A4、東ソー) を用いて 405 nm の吸光度を測定した。吸光度の程度により、反応性を次の基準で - ~ + + + + + で表し判定した。

(- : 0 以上 0.1 未満、± : 0.1 以上 0.2 未満、+ : 0.2 以上 0.4 未満、
++ : 0.4 以上 0.6 未満、+++ : 0.6 以上 0.8 未満、
++++ : 0.8 以上 1.0 未満、+++++ : 1.0 以上)

結果は、表 1 及び表 2 に示した通りである。

実施例 4 : サンドイッチアッセイ

下記の方法に従えば、実施例 2 で調製した抗トリプシンモノクローナル抗体から適当な 2 種の抗体の組み合わせ、例えばモノクローナル抗体クローン No. 004-203 およびモノクローナル抗体クローン No. 005-201 の組み合わせによって、トリプシンを特異的に検出・測定するサンドイッチ EIA 系が構成できる。また、モノクローナル抗体クローン No. 004-203 は、モノクローナル抗体クローン No. 005-208 と組み合わせて使用できる。同様に、モノクローナル抗体クローン No. 004-214 は、モノクローナル抗体クローン No. 005-201 あるいはクローン No. 005-208 と組み合わせて使用できる。各反応緩衝液の組成や反応条件は測定の目的に応じて、短縮、延長など調整できる。また、標準抗原のトリプシンは、膵臓あるいはその組織培養上清、または膵液から精製することができる。

たとえば、009-303 モノクローナル抗体 11.7 mg/ml を 5 ml 用い、0.5M NaCl/0.1M Na-Borate (pH8.0) で透析し、0.7 mg/ml に希釈し、71.3 ml を得た。C NBr activated Sepharose 4B (ファルマシア) 5 g を 1mM HCl 50 ml で 30 分膨潤し、アドバンテック 2 ろ紙 (アドバンテック) でろ過した。さらに、1mM HCl 800 ml で洗浄後、0.5M NaCl/0.1M Na-Borate (pH8.0) 100 ml で洗浄した。この樹脂に上記で作製した 009-303 抗体希釈液 71.3 ml を入れて懸濁し、4°C で一夜反応し、さらに室温で 3 時間振とうした。

これをアドバンテック 2 ろ紙でろ過し、0.5M NaCl/0.1M Na-Borate (pH8.0) 5

00 ml で洗浄後、0.2M Tris-HCl(pH8.0)で懸濁し、室温で 2時間反応した。これをアドバンテック2 ろ紙でろ過し、0.5M NaCl/0.1M Na-Borate (pH8.0)と0.5M NaCl/0.1M Na-Acetate (pH4.0) で各 500 ml で交互に 4回洗浄した。さらに、0.2M グリシン-HCl(pH2.3) 300 mlで洗浄後、0.1% NaN₃/0.1M Na-Phosphate (pH7.0) に置換し保存した。得られた009-303 モノクローナル抗体の固定化された樹脂につき、計算された IgGの保持率は 92.8%であった。

アフィニティー精製

犬脾臓をホモジネートした後、硫酸アンモニウム分画したサンプルを用いて、009-303 抗体カラムでアフィニティー精製を行った。

上記で得られた009-303 モノクローナル抗体固定化樹脂を 2mM CaCl₂/0.05M Tris-HCl(pH7.5)で置換し、カラムに詰めた。サンプルを 10 mgとり、2mM CaCl₂/0.05M Tris-HCl(pH7.5) 5 mlに溶解し、精製に用いた。フロースルー画分を分取後、2mM CaCl₂/0.2M グリシン-HCl(pH2.5) で溶出し、予め 2mM CaCl₂/3M Tris-HCl(pH7.5) を 1 ml 入れておいた試験管に 4 ml ずつ分取した。ピークをまとめ、2.59 mg のカチオニック トリプシンを得た。

また、トリプシンは、それ以外の各種アフィニティークロマトグラフィーの組み合わせによってもその精製は達成される。さらに、イオン交換、ゲルろ過等によっても精製することができる。

(a) 標識用金コロイドの調製

200 mlの蒸留水をその沸点まで加熱し、沸騰している中に4 mlの1% HAuCl₄ を添加し、更に 4 ml の1% Trisodium citrateを添加した。溶液の色が、青色から赤紫色になるまで加熱沸騰した後、室温にまで冷却した。得られた金コロイド溶液は0.2 μm のフィルターを通し、標識として使用した。

得られた金コロイドは、次のようにして滴定した。すなわち、1 mlずつ金コロイドを試験管にとり、それに抗体溶液を順次 0, 1, 2, 3, . . . , 15 μg となるように添加し、2分間攪拌した後、それぞれに100 μl の10% NaCl水溶液を添加し、5分間攪拌した。A₅₃₀の吸収を測定した。

(b) 標識抗体の調製

上記のようにして得られた50 ml の金コロイド液 (pH 9に調整したもの) に、2 mMのBorax (和光純薬工業 (株)) に対して透析した 1 mg/ml濃度の抗トリプシンモノクローナル抗体を5 ml添加し、5 分間攪拌した。次に10% 牛血清アルブミン (BSA)含有2 mMのBorax を5.5ml 添加した。得られた混合物を10,000 rpmで30分間遠心処理し、分離して得られた沈殿にさらに1%BSA 含有2 mM Boraxを添加してほぐし、再度10,000 rpmで30分間遠心処理し、こうして分離して得られた沈殿に1%BSA 含有10 mM TBS (和光純薬工業 (株), pH8.2)を添加してほぐした。得られた標識抗体は0.2 μ m のフィルターを通し、測定に使用した。

(c) モノクローナル抗体結合担体の調製

抗トリプシンモノクローナル抗体を 0.01Mリン酸緩衝液 (pH7.5) に溶解し、4 mg/ml の濃度に調製した。このモノクローナル抗体溶液と抗マウスIgG ポリクローナル抗体を 0.01Mリン酸緩衝液 (pH7.5) に溶解し、4 mg/ml の濃度に調製したポリクローナル抗体溶液を抗体結合用膜SNHF膜 (ミリポア) 上の異なる場所に1アッセイ当たり 1 μ l/lineとなるように付着させた。抗体溶液を付着させた膜は、50°Cで30分間乾燥した後、1% BSAを含む10 mM 炭酸- リン酸緩衝液 (pH7.5)に30分間浸し、次に0.05% Tween 20を含む5 mM炭酸- リン酸緩衝液 (pH7.5)に30分間浸してから、50°Cで30分間乾燥した。

(d) 抗マウスIgG ポリクローナル抗体の作製

精製マウスIgG (Jackson Immuno Research) を抗原として用いて抗マウスIgG ポリクローナル抗体を作製した。

抗原を 1 mg/100 μ l となるようにリン酸緩衝生理食塩液 (PBS, 0.1M, pH7.4) で調製し、それを等量の完全フロイントアジュバントと混合し、エマルジョンを調製する。該エマルジョンを 2 kg 日本白色種ウサギの背に皮下投与し (1 mg/200 μ l/羽)、初回免疫した。10日～2週間間隔をあけて、追加免疫した。この追加免疫では抗原を 1 mg/100 μ l となるように調製し、それを等量の不完全フロイントアジュバントと混合し、エマルジョンを調製し、該エマルジョンをウサギ

の背に皮下投与(1 mg/200 μ l/羽)した。

さらに、10日～2週間間隔をあけて、追加免疫した。必要に応じて、この間隔で免疫を繰り返すこともできる。最終免疫として、抗原を 1 mg/200 μ l となるように調製し、それをそのまま静脈内投与した。その3日後に耳静脈より、60 mlの採血を行った。採血した血液を4℃で一夜保存し、3000 rpm×20分間遠心分離を行い、上清(血清)を 30 ml採取した。この血清に等量のPBS (pH7.4) 30 mlを加え、飽和硫酸アンモニウム溶液を 30 ml加え、最終濃度 33%とした。4℃で一夜放置し、13000 rpm ×30分間遠心分離を行い、沈殿をとった。この沈殿に蒸留水を加え、懸濁し、0.03M Tris-HCl(pH8.3)-0.05M NaClで透析した。この透析サンプルを、DEAE-セファロース(ファルマシア)で、0.03M Tris-HCl(pH8.3)-0.05M NaClを移動相とし、イオン交換クロマトグラフィーを行った。フロースルーを分取し、抗マウスIgG ポリクローナル抗体として、4.56 mg/ml濃度の抗体 27.5 mlが得られ、-80℃で保存した。

(e) 標識抗体結合パットの調整

コンジュゲートパット(ポールゲルマン)を1% BSAを含む10 mM 炭酸-リン酸緩衝液(pH7.5)に30分間浸し、次に0.05% Tween 20を含む5 mM炭酸-リン酸緩衝液(pH7.5)に30分間浸してから、50℃で30分間乾燥した。乾燥したコンジュゲートパットに、0.05% Tween 20, 1% BSA及び 5% ショ糖を含む2 mMのBorax で希釈した金コロイド標識抗体を染み込ませ、50℃で30分間乾燥した。

(f) 1ステップサンドイッチアッセイ

上記(c)及び(e)で調整されたパーツを組立て、ラテラル フロー装置を作製し、アッセイに使用した。アフィニティークロマトグラフィーで精製したトリプシンを標準抗原として使用した。1% BSAを含む10 mM TBS (pH7.5)に精製したトリプシンを溶解し、濃度既知の標準抗原溶液を調製し、それを検体として50 μ lずつ、上記のようにして構成したラテラル フロー装置に適用する。トリプシン濃度 5～10 ng/mlのいずれにおいても金コロイド標識によるラインが観察でき、検知ができることが確認された。膜担体結合抗体と金コロイド標識抗体をサンド

イッチで組み合わせた結果を表 3 に示す。金コロイド標識抗体としてモノクローナル抗体クローンNo. 005-201を用い、膜担体結合抗体としてモノクローナル抗体クローンNo. 004-203を用いた場合が、より優れた検出感度を与えた。さらに、金コロイド標識抗体 009-303及び膜担体結合抗体 008-207の組み合わせで、感度が 0.5~1 ng/ml まで上昇した。

ラテラル フロー装置においては、抗トリプシンモノクローナル抗体を付着させた部分をサンプルライン、抗マウスIgG ポリクローナル抗体を付着させた部分をコントロールラインとした。

最高感度の 0.5~1 ng/ml では、サンプルライン、コントロールライン共に、金コロイドによる発色がみられた。臨床上必要とされるキットとするために、膜担体結合抗体量などを変えることにより、トリプシン標準抗原 2 ng/mlを用いた場合は、サンプルラインの発色が見られず、コントロールラインの発色のみ見られ、5 ng/mlを用いた場合は、サンプルライン、コントロールラインの両方の発色が見られた。このことにより、感度の調節及びカットオフ値の設定ができた。

第3表

| 膜 | 金コロイド | 004-203 | 004-214 | 005-201 | 005-208 | 008-207 | 009-303 |
|---------|-------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 004-203 | | | × | ○ | ○ | × | ○ |
| 004-214 | | × | | ○ | ○ | × | ○ |
| 005-201 | | ○ | ○ | | × | ○ | × |
| 005-208 | | ○ | ○ | × | | ○ | ○ |
| 008-207 | | × | × | ○ | ○ | | |
| 009-303 | | ○ | ○ | × | × | ○ | |

(g) 競合1ステップサンドイッチアッセイ

精製したトリプシンを0.1M リン酸緩衝液 (pH7.5) に溶解し、2 mg/ml の濃度に調製した。このトリプシン抗原溶液を競合用抗原結合用膜SNHF膜上に1アッ

セイ当たり $1 \mu\text{l}/\text{line}$ となるように付着させた。抗原溶液を付着させた膜は、 50°C で30分間乾燥した後、1% BSAを含む10 mM 炭酸-リン酸緩衝液 (pH7.5) に30分間浸し、次に0.05% Tween 20を含む5 mM炭酸-リン酸緩衝液 (pH7.5) に30分間浸してから、 50°C で30分間乾燥した。

こうして調製されたパーツ及び上記(e) で調整されたパーツを組立て、競合法用ラテラル フロー装置を作製し、アッセイに使用した。上記 (f) と同様に濃度既知の標準抗原溶液を調製し、それを検体として $50 \mu\text{l}$ ずつ、上記のようにして構成したラテラル フロー装置に適用した。トリプシン濃度 $250\sim 500 \text{ ng/ml}$ のいずれにおいても金コロイド標識によるラインが消失し、検知ができることが確認された。金コロイド標識抗体としてモノクローナル抗体クローンNo. 005-201を用いた場合、より優れた検出感度を与えた。

実施例 5 : 抗イヌトリプシンモノクローナル抗体を用いたウエスタンブロッティング

実施例 1 に従いイヌ膵臓より精製したイヌ カチオニック トリプシン標品 ($2.5 \mu\text{g}/\text{lane}$) を還元条件下 SDS-PAGE (10% total Acrylamide) に供した後、サンプルをニトロセルロース・フィルターに転写した。次に抗イヌトリプシンモノクローナル抗体クローン No. 005-208 (1 mg/ml) を反応させ、Nomura, H., et al., Cancer Res., 55, 3263-3266 (1995) に記載の方法に従ってアビジン・ビオチン・ペルオキシダーゼ複合法により可視化した (ウエスタンブロッティング)。その結果を図 1 に示した。抗イヌトリプシンモノクローナル抗体 (クローン No. 005-208) が、イヌトリプシン標品 (Cationic trypsin) と反応することを確認することができた。

実施例 6 : サンドイッチ EIA

(a) 酵素標識抗体 (IgG-HRP 複合体) の調製

(1) SH基標識 IgG の調製

J. Immunoassay, 4, 209~327, 1983 に記載の Ishikawa et al. の方法に従って抗イヌトリプシン IgG-HRP複合体を調製する。本発明で得られる、イヌトリプ

シンに対し反応性が認められるモノクローナル抗体 (IgG) を約0.1Mリン酸緩衝液 (pH約6.5) に対し透析し、その溶液に含有されるIgG に対して約100 倍モルの S-アセチルメルカプト無水コハク酸をDMF 溶液として加え、約30℃、約30分間インキュベーションする。次に、約100 μ l の約0.1Mトリス-塩酸緩衝液 (pH約7.0)、約10 μ l の約0.1M EDTA 溶液 (pH約6.0)、約100 μ l の約1Mヒドロキシルアミン溶液 (pH約7.0) を加え、約30℃、約5 分間静置後、約5mM EDTA含有約0.1Mリン酸緩衝液 (pH約6.0) で平衡化した Sephadex G-25でゲルろ過し、SH基標識抗イヌトリプシン IgG画分を得る。

(2) マレイミド標識HRP の調製

HRP を14.6 mg/mlの濃度になるように 0.1M リン酸緩衝液 (pH7.0) 28.3 μ l に溶解し、これにDMF 56 μ l に溶解したEMCS 5.6 mg をHRP 量に対して25倍モル量加え、30℃、30分間反応させた。この反応液を 0.1M リン酸緩衝液 (pH6.0) で平衡化した Sephadex G-25カラムでゲルろ過し、マレイミド標識HRP 画分を 9.2 mg 分取した。

(3) IgG-HRP複合体の調製

上記 (1) で調製したSH基標識IgG 約1 モルに上記 (2) で得られたマレイミド標識HRP 約5 モルを加え、約4℃で約20時間静置する。この混合液を約0.1Mリン酸緩衝液 (pH約6.5) で平衡化したウルトロゲル AcA 44 カラムでゲルろ過し、抗イヌトリプシン IgG-HRP複合体画分を分取し、約4℃で保存する。

(b) 酵素標識抗体 (Fab'-HRP 複合体) の調製

(1) Fab' の調製

本発明で得られる 009-303精製モノクローナル抗体 (IgG) 96 mgを 0.1M NaCl を含む 0.1 M酢酸緩衝液 (pH4.2) 7 ml に溶解し、その溶液を以下述べるようにしてペプシンで消化した。すなわち、上記IgG に対して 2% (w/w) のペプシン 700 μ l (1.92 mg) を加え、37℃、24時間消化した。さらにその消化物に、3M Tris-HCl 溶液 (pH7.5) 1.28 ml を加えてpHを 7.0に調整することによって反応を停

止させ、0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.0)で平衡化したウルトロゲル Ac A44 カラムを用いたゲルろ過により、 $F(ab')_2$ 画分を分取し、16 mg の $F(ab')_2$ を得た。次に、この $F(ab')_2$ を8 mg 用い、5mM EDTA含有 0.1M リン酸緩衝液 (pH6.0)中で透析し、最終濃度10 mM となるようにアミノエタンチオール塩酸塩を加え、37°Cで90分間還元した後、5mM EDTA含有0.1Mリン酸緩衝液 (pH6.0)で平衡化したウルトロゲル Ac A44 カラムを用いてゲルろ過し、Fab' 画分を分取し、Fab' を 4.7 mg 得た。

(2) Fab'-HRP複合体の調製

前記(1)項で調製したFab' 4 mg に対して、上記 (a)(2)項で得られた画分中のマレイミド標識HRP 3.5 mgを等モルになるように混合し、さらにFab' 及びマレイミド標識HRP の最終濃度が 50 μ M となるように、5mM EDTA含有0.1Mリン酸緩衝液 (pH6.0)で 1.2 ml に調製した。この混合液を4°C、20時間反応後、Fab' の10倍モル量の 0.1M N-エチルマレイミド 8.87 μ l を加え、未反応のSH基をブロックした。これを0.1Mリン酸緩衝液 (pH6.5)で平衡化したウルトロゲル Ac A44 カラムを用いてゲルろ過し、Fab'-HRP複合体画分を分取し、60 μ g/mlで 17 ml得て、これに0.1% BSAおよび0.001%クロルヘキシジンを添加して、-80°Cで保存した。

(c) モノクローナル抗体結合担体の調製

J. Immunoassay, 4, 209~327, 1983 に記載のIshikawa et al. の方法に従って、本発明で得られる 004-203精製モノクローナル抗体を0.1%アジ化ナトリウム含有0.1Mリン酸緩衝液(pH7.5)に溶解し、その濃度が 100 μ g/mlとなるように調製した。

このモノクローナル抗体溶液を96穴マイクロプレートにウエル当たり100 μ l ずつ加え、4°C、24時間静置した。次にモノクローナル抗体溶液を除去し、1%BSA, 0.1M 塩化ナトリウム及び10mM EDTA 含有30mMリン酸緩衝液(pH7.0, 緩衝液A)を各ウエルに300 μ l ずつ加え、4°Cで保存した。使用時 0.1M 塩化ナトリウム含有10mMリン酸緩衝液(pH7.0, 洗浄緩衝液)で3回洗浄し、用いた。

(d) 1ステップサンドイッチEIA 測定系の検索

イヌトリプシンを FBS (牛胎児血清) で希釈し96穴マイクロプレートに20 μ l 加えた。各モノクローナル抗体より調製した酵素標識抗体を100 ng/ml となるように 0.5% BSA 含有 0.05Mリン酸緩衝液 (pH8.0, 緩衝液B)で希釈し、上記マイクロプレートの各ウェルに各々100 μ l ずつ加え混和した。この混合液を前項(c)で各モノクローナル抗体より調製した抗体結合プレートに100 μ l 加え、37°Cで1時間反応させ、洗浄緩衝液で3回洗浄した。次に0.02% 過酸化水素含有0.1Mクエン酸-リン酸緩衝液 (pH4.9)に溶解した0.1 mg/ml 2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)をウェル当たり 100 μ l 加え、37°Cで50分間反応後、2N硫酸 100 μ l 添加し、反応を停止させた。この反応混液の A_{405} をマイクロプレートリーダー (MPR-A4, 東ソー) を用いて測定した。ここで用いる固相抗体及び標識抗体は、例えば表3における組み合わせを用いて測定することができる。測定は、二重で行うこととした。

(e) 1ステップサンドイッチEIA 法

FBS で、イヌトリプシン (標準試料) あるいはイヌトリプシンを含む検体を調製し96穴マイクロプレートに各々20 μ l 加えた。次に、上記 (a)及び(b) で調製した酵素標識抗体を 100 ng/mlとなるように 0.5% BSA 含有 0.05Mリン酸緩衝液 (pH8.0, 緩衝液B)で希釈し、上記マイクロプレートに100 μ l ずつ加え混和した。この混合液を前記(c) で調製した抗体結合プレートに 100 μ l 加え、37°Cで1時間反応させ、洗浄緩衝液で3回洗浄した。次に、0.02% 過酸化水素含有0.1Mクエン酸-リン酸緩衝液(pH4.9) に溶解した 0.1 mg/ml 2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)をウェル当たり 100 μ l 加え、37°Cで50分間反応後、2N硫酸 100 μ l 添加し反応を停止させた。この反応混液の A_{405} をマイクロプレートリーダーを用いて測定し検量線より、検体中のイヌトリプシン濃度を求める。イヌトリプシン標準試料の濃度の上昇に伴って A_{405} は直線的に増加した (図2)。

(f) 2ステップサンドイッチEIA 法

FBS で、イヌトリプシン（標準試料）あるいはイヌトリプシンを含む検体を調製し96穴マイクロプレートに各々20 μ l 加えた。次に緩衝液B を上記プレートに各々100 μ l ずつ加え混和した。この混合液を前記(c) で調製した抗体結合プレートに 100 μ l 加え、37°Cで1時間反応させ、洗浄緩衝液で3回洗浄した。次に、上記(a) で調製した酵素標識抗体IgG-HRP を 100 ng/mlとなるように緩衝液B で希釈し、上記プレートに 100 μ l ずつ加え、37°Cで1時間反応させ、洗浄緩衝液で3回洗浄した。次に、0.02% 過酸化水素含有0.1Mクエン酸ーリン酸緩衝液（pH4.9）に溶解した 0.1 mg/ml 2,2'-アジノ-ビス（3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸）をウェル当たり 100 μ l 加え、37°Cで30分間反応後、2N硫酸 100 μ l 添加し反応を停止させた。この反応混液の A_{405} をマイクロプレートリーダーを用いて測定し、検量線より、検体中のイヌトリプシン濃度を求める。イヌトリプシン標準試料の濃度の上昇に伴って A_{405} は直線的に増加した（図3）。

(g) 再現性試験

前記(e) に記載した方法に従い、同時再現性試験及び測定日間再現性試験を行った。モノクローナル抗体結合担体は、上記(c) を用い、酵素標識抗体は、上記(b) のFab'-HRPを用いて、正常イヌ血清について、同時再現性試験(n=8) 及び測定日間再現性試験(n=3) を実施した。いずれも良好な再現性が得られた（表4及び表5）。

第4表 同時再現性試験

| | 測定値 (ng/ml) | CV (%) |
|------|-----------------|--------|
| 血清 1 | 5.4 \pm 0.58 | 10.7 |
| 血清 2 | 16.8 \pm 1.29 | 7.7 |
| 血清 3 | 12.9 \pm 0.95 | 7.4 |

第 5 表 測定日間再現性試験 (ng/ml)

| 検体 | 1st | 2nd | 3rd | 平均 | 偏差 | CV (%) |
|----|------|------|------|------|------|--------|
| 1 | 21.4 | 24.9 | 23.9 | 23.4 | 1.79 | 7.7 |
| 2 | 4.2 | 4.9 | 4.4 | 4.5 | 0.38 | 8.3 |
| 3 | 9.7 | 11.3 | 11.6 | 10.9 | 1.02 | 9.4 |
| 4 | 15.6 | 18.7 | 16.7 | 17.0 | 1.54 | 9.1 |

(h) 添加回収試験

予め、イヌ血清（イヌトリプシン含有）10 μ l に標準試料液（15又は35 ng/ml）10 μ l を加え、さらに100 μ l の酵素標識抗体(Fab'-HRP)液を加えた。この混合液を抗体結合プレートに 100 μ l 加え、前記(e) に記載した方法と同様にしてイヌトリプシン量を測定し回収率を算出した。その結果、102%の添加回収率となり、いずれも十分な回収率が得られた（表 6）。

第 6 表 添加回収率

| 検体 | 測定値 (ng/ml) | 添加回収率 (%) |
|-----------------|-------------|-----------|
| イヌ血清 | 5.52 | |
| イヌ血清 + 15 ng/ml | 20.821 | 102.0 |
| イヌ血清 + 35 ng/ml | 41.296 | 102.2 |

以上の測定系を使用して、各種疾患を有するイヌ血清中のトリプシン量を測定したところ、急性膵炎ではトリプシン量が健常なイヌ血清中のトリプシン量と比較して有意に高くなり、膵外分泌不全ではトリプシン量が有意に低くなることが

認められた。

すなわち、各種検査を行い、総合的判断で膵炎または膵外分泌不全症と診断されたイヌにおいて、前記(e)に記載した方法と同様にしてイヌトリプシン量を測定した。膵炎3例において、40.35, 70.32, 90.9 ng/mlと高値を示し、膵外分泌不全症2例においては、1.35, 0.18 ng/mlと低値を示した。正常イヌ21例での測定値の平均は 14.8 ± 4.71 ng/mlであり、イヌトリプシンを測定することにより、膵炎、膵外分泌不全の診断に有用であることが示された。

実施例7：ヒトトリプシン測定EIA 法によるイヌトリプシンの測定

ヒトトリプシンモノクローナル抗体による測定用試薬を用いてイヌトリプシンを測定した。イヌトリプシンは、実施例1に従いイヌ膵臓より調製した Cationic Trypsin 又は Anionic Trypsinを用い、ヒトトリプシン測定用試薬は、ヒト用の体外診断薬コダザイムトリプシン M・EIA（日本ヘキスト・マリオン・ルセル）を用いた。測定は、コダザイムトリプシン M・EIA に記載の方法に従い、次のように行った。

精製した Cationic Trypsin 及びAnionic Trypsin を、各々0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.5) に溶解し、0.5mg/ml濃度に調製した。この溶液を5 μ l ずつとり、0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.5)を加え、最終濃度400ng/mlとしトリプシン溶液とした。このトリプシン溶液を150 μ l ずつエッペンチューブに取り、さらに0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.5)を加え、200、100、50、25、12.5及び6.25ng/ml の各濃度のトリプシン液を調製した。同様にして、コダザイムトリプシン M・EIA キットに添付されていたヒトトリプシン標準品から、600、400、200、100、50及び10 ng/mlの各濃度のトリプシン液を調製した。各濃度のトリプシン液を小試験管に各々50 μ l ずつ入れ、標識抗体を300 μ l ずつ加え、さらに、抗体結合ボールを1個ずつ加え、37°Cで30分間反応させ、洗浄液で2回ボールを洗浄した(2ml \times 2)。ボールを新しい試験管に移し、基質液を各500 μ l 入れ、その後反応停止液を各3 ml加え、反応を停止させた。アッセイはそれぞれ2回行った。

各反応液の $A_{492\text{ nm}}$ を測定したところ、Cationic Trypsin、Anionic Trypsin は共に、コダザイムトリプシン M・EIA のヒトトリプシンモノクローナル抗体と

は反応しなかったことが確かめられた。このことより、ヒトトリプシンモノクローナル抗体を用いて、イヌ Cationic Trypsin 及びイヌ Anionic Trypsinを測定することができないことが判明した。結果を表7～表9に示す。

第7表

| | ヒトトリプシン標準品濃度 (ng/ml) | | | | | | |
|--------------------|----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 0 | 10 | 50 | 100 | 200 | 400 | 600 |
| A ₄₉₂ 値 | 0.017 | 0.065 | 0.224 | 0.399 | 0.538 | 1.147 | 1.584 |
| | 0.017 | 0.131 | 0.202 | — | 0.697 | 0.953 | — |

第8表

| | イヌCationic Trypsin濃度 (ng/ml) | | | | | | |
|--------------------|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 6.25 | 12.5 | 25 | 50 | 100 | 200 | 400 |
| A ₄₉₂ 値 | 0.048 | 0.021 | 0.023 | 0.017 | 0.029 | 0.017 | 0.021 |
| | 0.019 | 0.019 | 0.018 | 0.017 | 0.019 | 0.015 | 0.019 |

第 9 表

| | イヌAnionic Trypsin 濃度 (ng/ml) | | | | | | |
|--------------------|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 6.25 | 12.5 | 25 | 50 | 100 | 200 | 400 |
| A ₄₉₂ 値 | 0.023 | 0.020 | 0.023 | 0.021 | 0.020 | 0.023 | 0.032 |
| | 0.023 | 0.024 | 0.021 | 0.020 | 0.022 | 0.019 | 0.038 |

産業上の利用可能性

イヌトリプシンに特異的に反応するモノクローナル抗体を作成し免疫学的組織染色など、トリプシンの検出手段並びにそのための試薬を提供できる。また、トリプシンを検出、測定する方法、例えば、EIA 系を提供する。本発明は、前述の説明及び実施例に特に記載した以外も、実行できることは明らかである。上述の教示に鑑みて、本発明の多くの改変及び変形が可能であり、従ってそれらも本件添付の請求の範囲の範囲内のものである。

請 求 の 範 囲

1. イヌトリプシンあるいはイヌトリプシン関連物質に対するモノクローナル抗体。

2. カチオニック イヌトリプシノーゲン、アニオニック イヌトリプシノーゲン、カチオニック イヌトリプシン、アニオニック イヌトリプシン及びそれから誘導されるイヌトリプシン関連物質からなる群から選ばれたものに対する抗体であることを特徴とする請求項1記載のモノクローナル抗体。

3. (a) 配列表の配列番号1又は配列番号2のタンパク質またはその塩及び(b) その部分ペプチドまたはその塩からなる群から選ばれたものに対する抗体であることを特徴とする請求項1記載のモノクローナル抗体。

4. カチオニック イヌトリプシノーゲン、カチオニック イヌトリプシン、及びそれから誘導されるカチオニック イヌトリプシン関連物質からなる群から選ばれたものに対する抗体であることを特徴とする請求項1～3のいずれか一記載のモノクローナル抗体。

5. 該抗体が、

(1) 配列表の配列番号1のThr¹⁶～Ser²⁴⁷で表されるアミノ酸配列、

(2) 配列表の配列番号1のIle²⁴～Ser²⁴⁷で表されるアミノ酸配列、

(3) 配列表の配列番号2のPhe¹⁶～Asn²⁴⁶で表されるアミノ酸配列、及び

(4) 配列表の配列番号2のIle²⁴～Asn²⁴⁶で表されるアミノ酸配列

からなる群から選ばれたいずれかの配列に対するものであることを特徴とする請求項1～3のいずれか一記載のモノクローナル抗体。

6. 請求項1～5のいずれか一記載のモノクローナル抗体を測定試薬として用いることを特徴とするトリプシン及び／又はトリプシン様免疫反応物質の免疫学的測定方法。

7. トリプシン様免疫反応物質が、トリプシノーゲン、トリプシン、及びインヒビターとの複合体からなる群から選ばれたいずれかであることを特徴とする請求項6記載の方法。

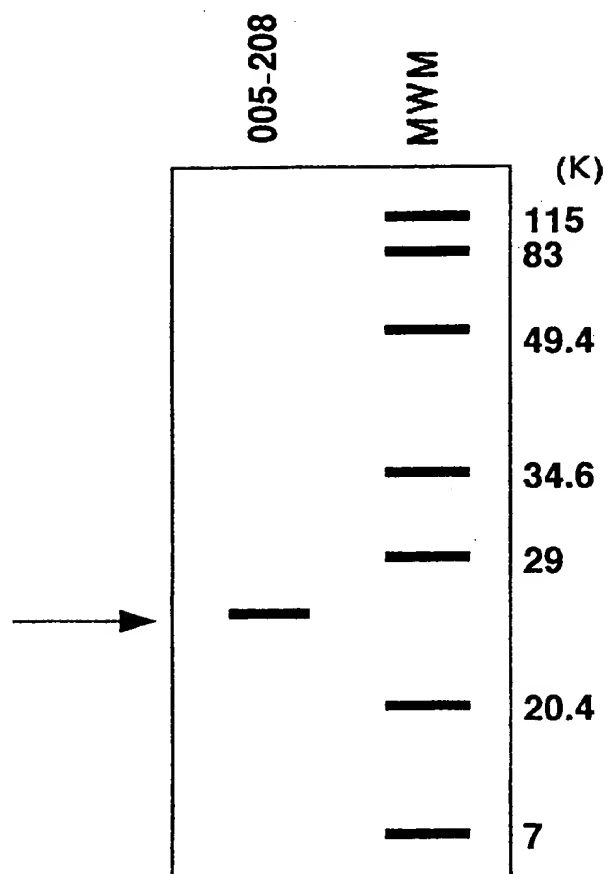
8. 請求項1～5のいずれか一記載のモノクローナル抗体を含むことを特徴とするトリプシン及び／又はトリプシン様免疫反応物質の免疫学的測定試薬。

9. トリプシン様免疫反応物質が、トリプシノーゲン、トリプシン、及びインヒビターとの複合体からなる群から選ばれたいずれかであることを特徴とする請求項8記載の試薬。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

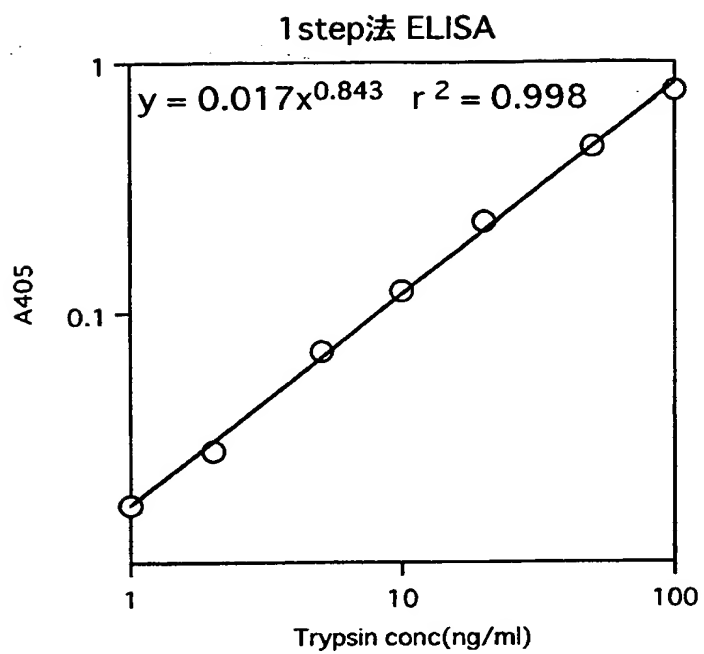
1 / 3

☒ 1



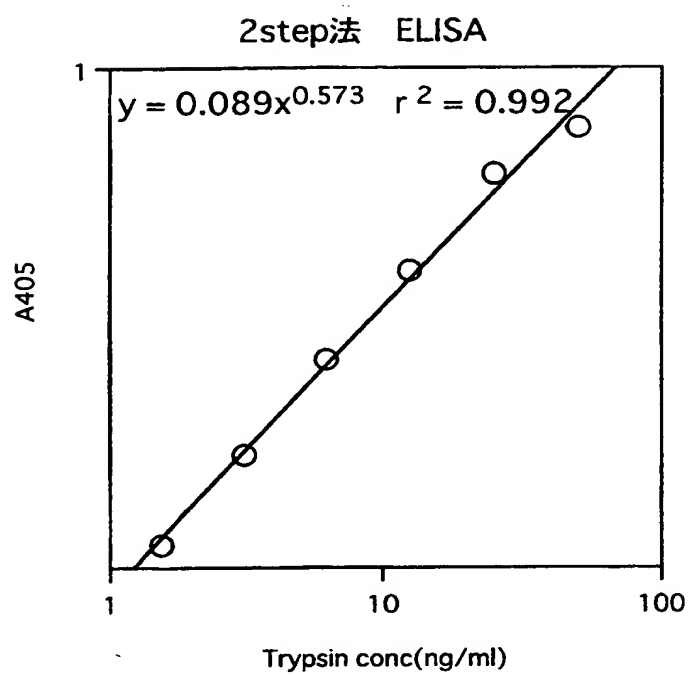
THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 2



THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 3



THIS PAGE BLANK (USPTO)

1 / 3

SEQUENCE LISTING

<110> Fuji Yakuhin Kogyo Kabushiki Kaisha

<120> Monoclonal Antibody against Canine Trypsin

<130> FJ-94PCT

<140>

<141>

<150> JP 10-236609

<151> 1998-08-10

<150> JP 11-63990

<151> 1999-03-10

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 247

<212> PRT

<213> Dog Pancreas

<400> 1

Met Asn Pro Leu Leu Ile Leu Ala Phe Leu Gly Ala Ala Val Ala Thr
1 5 10 15Pro Thr Asp Asp Asp Asp Lys Ile Val Gly Gly Tyr Thr Cys Glu Glu
20 25 30Asn Ser Val Pro Tyr Gln Val Ser Leu Asn Ala Gly Tyr His Phe Cys
35 40 45Gly Gly Ser Leu Ile Ser Asp Gln Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys
50 55 60Tyr Lys Ser Arg Ile Gln Val Arg Leu Gly Glu Tyr Asn Ile Asp Val
65 70 75 80Leu Glu Gly Asn Glu Gln Phe Ile Asn Ser Ala Lys Val Ile Arg His
85 90 95Pro Asn Tyr Asn Ser Trp Ile Leu Asp Asn Asp Ile Met Leu Ile Lys
100 105 110Leu Ser Ser Pro Ala Val Leu Asn Ala Arg Val Ala Thr Ile Ser Leu
115 120 125Pro Arg Ala Cys Ala Ala Pro Gly Thr Gln Cys Leu Ile Ser Gly Trp
130 135 140Gly Asn Thr Leu Ser Ser Gly Thr Asn Tyr Pro Glu Leu Leu Gln Cys
145 150 155 160

Leu Asp Ala Pro Ile Leu Thr Gln Ala Gln Cys Glu Ala Ser Tyr Pro

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2 / 3

165 170 175
 Gly Gln Ile Thr Glu Asn Met Ile Cys Ala Gly Phe Leu Glu Gly Gly
 180 185 190
 Lys Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Val Val Cys Asn Gly
 195 200 205
 Glu Leu Gln Gly Ile Val Ser Trp Gly Tyr Gly Cys Ala Gln Lys Asn
 210 215 220
 Lys Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val Cys Asn Phe Val Asp Trp Ile Gln
 225 230 235 240
 Ser Thr Ile Ala Ala Asn Ser
 245

<210> 2
 <211> 246
 <212> PRT
 <213> Dog Pancreas

<400> 2
 Met Lys Thr Phe Ile Phe Leu Ala Leu Leu Gly Ala Thr Val Ala Phe
 1 5 10 15
 Pro Ile Asp Asp Asp Asp Lys Ile Val Gly Gly Tyr Thr Cys Ser Arg
 20 25 30
 Asn Ser Val Pro Tyr Gln Val Ser Leu Asn Ser Gly Tyr His Phe Cys
 35 40 45
 Gly Gly Ser Leu Ile Asn Ser Gln Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys
 50 55 60
 Tyr Lys Ser Arg Ile Gln Val Arg Leu Gly Glu Tyr Asn Ile Ala Val
 65 70 75 80
 Ser Glu Gly Gly Glu Gln Phe Ile Asn Ala Ala Lys Ile Ile Arg His
 85 90 95
 Pro Arg Tyr Asn Ala Asn Thr Ile Asp Asn Asp Ile Met Leu Ile Lys
 100 105 110
 Leu Ser Ser Pro Ala Thr Leu Asn Ser Arg Val Ser Ala Ile Ala Leu
 115 120 125
 Pro Lys Ser Cys Pro Ala Ala Gly Thr Gln Cys Leu Ile Ser Gly Trp
 130 135 140
 Gly Asn Thr Gln Ser Ile Gly Gln Asn Tyr Pro Asp Val Leu Gln Cys
 145 150 155 160
 Leu Lys Ala Pro Ile Leu Ser Asp Ser Val Cys Arg Asn Ala Tyr Pro
 165 170 175
 Gly Gln Ile Ser Ser Asn Met Met Cys Leu Gly Tyr Met Glu Gly Gly
 180 185 190

THIS PAGE BLANK (USPTO)

3 / 3

Lys Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Val Val Cys Asn Gly
 195 200 205

Glu Leu Gln Gly Val Val Ser Trp Gly Ala Gly Cys Ala Gln Lys Gly
 210 215 220

Lys Pro Gly Val Ser Pro Lys Val Cys Lys Tyr Val Ser Trp Ile Gln
 225 230 235 240

Gln Thr Ile Ala Ala Asn
 245

<210> 3

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed
 peptide to act as an immunogen

<400> 3

Cys Leu Ile Ser Gly Trp Gly Asn Thr Gln Ser Ile Gly Gln Asn Tyr
 1 5 10 15

Pro Asp Val Leu
 20

<210> 4

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed
 peptide to act as an immunogen

<400> 4

Ile Val Gly Gly Tyr Thr Cys Ser Arg Asn Ser Val Pro Tyr Gln Val
 1 5 10 15

Ser Leu Asn Ser
 20

<210> 5

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Designed
 peptide to act as an immunogen

<400> 5

Leu Gln Gly Val Val Ser Trp Gly Ala Gly Cys Ala Gln Lys Gly Lys
 1 5 10 15

Pro Gly Val Ser
 20

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04299

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P21/08, C07K16/40, C07K16/18, C12Q1/34, G01N33/573, G01N33/577
C12N15/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12P21/08, C07K16/40, C7K16/18, C12Q1/34, G01N33/573, G01N33/577
C12N15/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| X | Pinsky S.D. et al. "Differential regulation of trypsinogen messenger RNA translation full-length messenger RNA sequences encoding two oppositely charged trypsinogen isoenzymes in the dog pancreas" Mol. Cell. Biol. (1985), Vol. 5, No. 10, pages 2669-2676 | 1-9 |
| A | Odette GUY-CROTTE et al. "monoclonal Antibodies to human pancreatic trypsin 1 inhibit the activation of human trypsinogens 1 and 2 " Eur. J. Biochem. (1992), Vol. 204, pages 133-136 | 1-9 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
02 November, 1999 (02.11.99)Date of mailing of the international search report
16 November, 1999 (16.11.99)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

C12P21/08, C07K16/40, C07K16/18, C12Q1/34, G01N33/573, G01N33/577, C12N15/06

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

C12P21/08, C07K16/40, C07K16/18, C12Q1/34, G01N33/573, G01N33/577, C12N15/06

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| X | Pinsky S D et al. "Differential regulation of trypsinogen messenger RNA translation full-length messenger RNA sequences encoding two oppositely charged trypsinogen isoenzymes in the dog pancreas" Mol. Cell. Biol. (1985) 第5巻 第10号 p. 2669-2676 | 1-9 |
| A | Odette GUY-CROTTE et al. "Monoclonal Antibodies to human pancreatic trypsin 1 inhibit the activation of human trypsinogens 1 and 2" Eur. J. Biochem. (1992) 第204巻 p. 133-136 | 1-9 |

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

02.11.99

国際調査報告の発送日

16.11.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

加藤 浩

印

4 B

9050

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

| | | |
|---|---|---|
| Applicant's or agent's file reference FJ-94PCT | FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416) | |
| International application No. PCT/JP99/04299 | International filing date (day/month/year) 09 August 1999 (09.08.99) | Priority date (day/month/year) 10 August 1998 (10.08.98) |
| International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12P 21/08, C07K 16/40, 16/18, C12Q 1/34, G01N 33/573, 33/577, C12N 15/06 | | |
| Applicant FUJI YAKUHHN KOGYO KABUSHIKI KAISHA | | |

| | |
|--|---|
| 1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36. | |
| 2. This REPORT consists of a total of <u>3</u> sheets, including this cover sheet. | |
| <input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). | |
| These annexes consist of a total of _____ sheets. | |
| 3. This report contains indications relating to the following items: | |
| I | <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report |
| II | <input type="checkbox"/> Priority |
| III | <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability |
| IV | <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention |
| V | <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement |
| VI | <input type="checkbox"/> Certain documents cited |
| VII | <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application |
| VIII | <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application |

| | |
|---|--|
| Date of submission of the demand 27 August 1999 (27.08.99) | Date of completion of this report 01 August 2000 (01.08.2000) |
| Name and mailing address of the IPEA/JP | Authorized officer |
| Facsimile No. | Telephone No. |

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/04299

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/04299

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

| | | | |
|-------------------------------|--------|-----|-----|
| Novelty (N) | Claims | 1-9 | YES |
| | Claims | | NO |
| Inventive step (IS) | Claims | | YES |
| | Claims | 1-9 | NO |
| Industrial applicability (IA) | Claims | | YES |
| | Claims | 1-9 | NO |

2. Citations and explanations

Claims 1-5

Document 1 [Differential regulation of trypsinogen messenger RNA translation full-length messenger RNA sequences encoding two oppositely charged trypsinogen isoenzymes in the dog pancreas, (Pinsky, S.D. et al.), Mol. Cell. Biol., 1985, Vol. 5, No. 10, pages 2669-2676] discloses canine trypsin, and it is considered that using this to obtain 'a monoclonal antibody against canine trypsin' would be obvious to a person skilled in the art.

Claims 6-9

It is considered that assaying an antigen by using a monoclonal antibody as an assay reagent constitutes well-known art. It is thus considered that obtaining a monoclonal antibody against canine trypsin following the disclosures in document 1 and then using this as an assay reagent in order to assay trypsin or the like would be obvious to a person skilled in the art.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

EO/US
PCT/JP99/04299

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C. 20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing:

24 February 2000 (24.02.00)

International application No.:

PCT/JP99/04299

Applicant's or agent's file reference:

FJ-94PCT

International filing date:

09 August 1999 (09.08.99)

Priority date:

10 August 1998 (10.08.98)

Applicant:

WARITANI, Takaki et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:

27 August 1999 (27.08.99)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

J. Zahra

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

REC'D 25 AUG 2000

P C T

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
〔PCT36条及びPCT規則70〕

| | | |
|--|--|--------------------------------|
| 出願人又は代理人 の書類記号 F J - 9 4 P C T | 今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ I P E A / 4 1 6）を参照すること。 | |
| 国際出願番号 P C T / J P 9 9 / 0 4 2 9 9 | 国際出願日 (日.月.年) 0 9 . 0 8 . 9 9 | 優先日 (日.月.年) 1 0 . 0 8 . 9 8 |
| 国際特許分類 (I P C) Int. Cl ⁷ C12P21/08, C07K16/40, C07K16/18, C12Q1/34, G01N33/573, G01N33/577, C12N15/06 | | |
| 出願人 (氏名又は名称) 富士薬品工業株式会社 | | |

- 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条（PCT36条）の規定に従い送付する。
- この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。
☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で ページである。
- この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
 - ☒ 国際予備審査報告の基礎
 - ☐ 優先権
 - ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
 - ☐ 発明の単一性の欠如
 - ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
 - ☐ ある種の引用文献
 - ☐ 国際出願の不備
 - ☐ 国際出願に対する意見

| | | |
|--|---|------------------|
| 国際予備審査の請求書を受理した日 2 7 . 0 8 . 9 9 | 国際予備審査報告を作成した日 0 1 . 0 8 . 0 0 | |
| 名称及びあて先 日本国特許庁 (I P E A / J P) 郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 | 特許庁審査官 (権限のある職員) 加藤 浩 電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8 | 4 B 9 0 5 0 印 |

THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)

請求の範囲

1-9

有

請求の範囲

無

進歩性(IS)

請求の範囲

1-9

有

請求の範囲

無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲

1-9

有

請求の範囲

無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

請求の範囲1-5

文献1: Pinsky S D et al. "Differential regulation of trypsinogen messenger RNA translation full-length messenger RNA sequences encoding two oppositely charged trypsinogen isoenzymes in the dog pancreas" Mol. Cell. Biol. (1985) 第5巻 第10号 p. 2669-2676
 には、イヌトリプシンが記載されており、これを用いて「イヌトリプシンに対するモノクローナル抗体」を得ることは、当業者にとって自明である。

請求の範囲6-9

モノクローナル抗体を測定試薬として用いて抗原の測定を行うことは、周知技術であり、文献1の記載に基づいてイヌトリプシンに対するモノクローナル抗体を得、これを測定試薬として用いてトリプシン等の測定を行うことは、当業者にとって自明である。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

E P



P C T

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

| | | |
|-----------------------------------|---|--------------------------------|
| 出願人又は代理人 の書類記号 F J - 9 4 P C T | 今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。 | |
| 国際出願番号 PCT/J P 9 9 / 0 4 2 9 9 | 国際出願日 (日.月.年) 0 9 . 0 8 . 9 9 | 優先日 (日.月.年) 1 0 . 0 8 . 9 8 |
| 出願人 (氏名又は名称) 富士薬品工業株式会社 | | |

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

- a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。
☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。
- b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。
☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。
☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。
☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、
 第 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。 ☒ なし
☐ 出願人は図を示さなかった。
☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

C12P21/08, C07K16/40, C07K16/18, C12Q1/34, G01N33/573, G01N33/577, C12N15/06

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

C12P21/08, C07K16/40, C07K16/18, C12Q1/34, G01N33/573, G01N33/577, C12N15/06

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| X | Pinsky S D et al. "Differential regulation of trypsinogen messenger RNA translation full-length messenger RNA sequences encoding two oppositely charged trypsinogen isoenzymes in the dog pancreas" Mol. Cell. Biol. (1985) 第5巻 第10号 p. 2669-2676 | 1-9 |
| A | Odette GUY-CROTTE et al. "Monoclonal Antibodies to human pancreatic trypsin 1 inhibit the activation of human trypsinogens 1 and 2" Eur. J. Biochem. (1992) 第204巻 p. 133-136 | 1-9 |

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

02. 11. 99

国際調査報告の発送日

16. 11. 99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

加藤 浩

4 B

9050

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

THIS PAGE BLANK (USPTO)